

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Caracterización molecular y genética de los  
marcadores ligados al gen Ryadg del cromosoma XI de  
Solanum tuberosum ssp andigena y su aplicación en la  
identificación de nuevas fuentes de resistencia al virus  
PVY**

**TESIS**

para optar al grado académico de Magíster en Biología Molecular

**AUTOR**

Frank Lino Guzmán Escudero

**Lima – Perú**

**2010**

A mi familia

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Dr. Marc Ghislain por la oportunidad de realizar el presente trabajo y por permitirme desenvolverme profesionalmente, gracias por todo el apoyo brindado.

A Charito Herrera, por su supervisión en el desarrollo del presente trabajo y ser como una segunda madre por escucharme, aconsejarme y soportarme.

A los miembros del Laboratorio de Marcadores Moleculares: mis “manitas” Claudia Gutiérrez y Cinzia Riccio por los momentos de incertidumbre cuando nos quedamos sin “madre” o cuando habían problemas de todo tipo en grupo PVY, así como también por los momentos agradables, a los técnicos José Rodríguez y Luciano Fernández por toda la ayuda brindada y las conversaciones relajantes y desestresantes. Quisiera agradecer de manera especial a Laura Jara, por ser mi primera “hija” y ayudarme a terminar este trabajo.

A los profesores de la maestría, por las ganas mostradas en que aprendamos y desarrollemos una de las cosas más preciadas en estos tiempos: el criterio. De manera especial quiero agradecer a los doctores Pablo Ramírez, Rina Ramírez y Libertad Alzamora.

A mis compañeros de la maestría, por vivir junto a mí dos años de alegrías y sufrimientos, y por permitirme demostrar que las personas pueden cambiar.

A las amistades que he podido conseguir, mantener y apreciar a lo largo de todos estos años, gracias por todo. De manera especial quiero agradecer a Ada Sumi, Lina Bernaola, María Elena González, Marianella Ayala, Gabriela Lajo, Evelyn Cuadros, Martha Matta, Milagros Ormeño, Danny Salvador, José Luis Torero, Daniel Torero, Michael Jaramillo, Geoffrey González, Edgar Neyra, Michael Torres, Diego Pignataro, Julio Cachay, Manuel Ramírez, Milton Untiveros.

De manera muy especial, quiero agradecer a Jacqueline Valverde. Gracias por aparecer en mi vida de una manera poco convencional y enseñarme día a día (a la distancia o de manera normal) que en esta vida existen cosas buenas que en el pasado desconocía o ignoraba, que la distancia o tiempo no pueden ser grandes problemas como piensa la mayoría, y que lo más importante es darse la oportunidad para ser feliz, gracias por todo princesa.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) por haber hecho posible el desarrollo de la presente tesis, y al Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por el financiamiento proporcionado para los estudios de maestría.

# INDICE

---

	Pág.
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>INDICE</b>	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABLAS</b>	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
2.1. Las papas cultivadas	
2.1.1. Posición taxonómica	3
2.1.2. Generalidades	3
2.1.3. <i>Solanum tuberosum</i> ssp <i>andigena</i>	4
2.2. El virus Y de la papa	
2.2.1. Generalidades	4
2.2.2. Variabilidad	5
2.2.3. Importancia económica y ambiental	5
2.3. Resistencia a PVY en papa	
2.3.1. Generalidades	6
2.3.2. Resistencia en <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i>	6
2.3.3. Resistencia en <i>S. stoloniferum</i>	7
<b>3. HIPÓTESIS</b>	9
<b>4. OBJETIVOS</b>	9
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1. Materiales	
5.1.1. Población para identificar recombinantes	10
5.1.2. Población para identificar nuevas fuentes de resistencia	11
5.2. Métodos	
5.2.1. Identificación de recombinantes	

5.2.1.1. Extracción de DNA	11
5.2.1.2. Amplificación de marcadores moleculares	12
5.2.1.3. Registro de datos	15
5.2.1.4. Confirmación de los individuos recombinantes	15
5.2.1.5. Prueba de Chi cuadrado	16
5.2.1.6. Cálculo de la distancia genética entre los marcadores	17
5.2.1.7. Tamizado para la resistencia a PVY	18
5.2.1.8. Mantenimiento y propagación de los recombinantes	19
5.2.2. Identificación de nuevas fuentes de resistencia a PVY	
5.2.2.1. Amplificación de marcadores moleculares	20
5.2.2.2. Confirmación de los individuos positivos	20
5.2.2.3. Comprobación de la identidad de las entradas positivas	20
5.2.2.4. Clonamiento de los amplificados	22
5.2.2.5. Obtención de DNA plasmídico	25
5.2.2.6. Secuenciamiento de los fragmentos	26
5.2.2.7. Comparación de secuencias	27
5.2.2.8. Búsqueda de secuencias homólogas	27
5.2.2.9. Tamizado para la resistencia a PVY	28
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
6.1. Marcadores Ry en la población Costanera x LBr-43	29
6.2. Recombinantes de los marcadores Ry	30
6.3. Detección del gen Ry en <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i>	34
6.4. Comprobación de la identidad y resistencia a PVY de Pisha Milpo	40
<b>7. CONCLUSIONES</b>	43
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	44
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	45
<b>10. ANEXOS</b>	53

## LISTA DE FIGURAS

---

	Pág.
Figura 1. Plántulas de la progenie Costanera x LBr-43 crecidas en invernadero	10
Figura 2. Colecta de las muestras de hojas de las plántulas de la población Costanera x LBr-43 en cajas de dilución de 96 pocillos	12
Figura 3. Mapa del vector pGEM®-T Easy	23
Figura 4. Productos de PCR obtenidos con los marcadores (a) RySC3, (b) M45 y (c) M6 en los individuos de la población Costanera x LBr-43 en gel de agarosa al 1%	29
Figura 5. a) Posición relativa de los marcadores RySC3, M6 y M45 en la variedad Costanera. b) Genotipos de los individuos recombinantes obtenidos en el presente estudio en base a los puntos de recombinación reportados.	32
Figura 6. Productos de PCR obtenidos con el marcador RySC3 en las entradas de la población de <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> en gel de agarosa al 1%	35
Figura 7. Productos de PCR obtenidos con el marcador M45 en las entradas de la población de <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> en gel de agarosa al 1%	35
Figura 8. Productos de PCR del marcador M6 digeridos en las entradas de la población de <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> en gel de agarosa al 1%	36
Figura 9. Alineamiento entre las secuencias obtenidos con el marcador RySC3 en la variedad 2x(V-2)7 y la entrada Pisha Milpo	36
Figura 10. Alineamiento entre las secuencias obtenidos con el marcador M45 en la variedad I-1039 y la entrada Pisha Milpo	37
Figura 11. Alineamiento entre las secuencias de los alelos dominantes o resistentes obtenidos con el marcador M6 en la variedad I-1039 y la entrada Pisha Milpo	39
Figura 12. Productos de PCR obtenidos con el marcador de cloroplasto en entradas de <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> y <i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i> en gel de agarosa al 1%	40
Figura 13. Productos de PCR obtenidos con el marcador microsatelite STI0032 en la entrada Pisha Milpo en gel de poliacrilamida al 6.5%	41
Figura 14. Plántula de la entrada Pisha Milpo 25 días después de ser inoculada con PVY <sup>o</sup>	42
Figura 15. Plántula de la variedad LBr-43 25 días después de ser inoculada con PVY <sup>o</sup>	42

## LISTA DE TABLAS

---

	Pág.
Tabla 1. Lista de iniciadores específicos ligados al gen <i>Ry</i> del cromosoma XI utilizados en el presente estudio	13
Tabla 2. Concentración final de los reactivos utilizados en la amplificación por PCR de los marcadores ligados al gen <i>Ry</i> del cromosoma XI	13
Tabla 3. Protocolo de PCR de los marcadores ligados al gen <i>Ry</i> del cromosoma XI	14
Tabla 4. Marcadores microsatélites del Potato Genotyping Identification Kit	22
Tabla 5. Volumen de los reactivos utilizados en la ligación de los productos de PCR en el vector pGEM	24
Tabla 6. Volumen de los reactivos utilizados en la digestión de los plásmidos purificados	26
Tabla 7. Análisis de $\chi^2$ de la segregación de los marcadores RySC3, M45 y M6 en la población Costanera x LBr-43	31
Tabla 8. Secuencia nucleotídica consenso de los fragmentos obtenidos con los marcadores RySC3 y M45 en la entrada Pisha Milpo	34
Tabla 9. Secuencia nucleotídica consenso del alelo dominante del marcador M6 de Pisha Milpo	38



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ABL	Laboratorio de Biotecnología Aplicada
AFLP	Polimorfismo en Longitud de Fragmentos Amplificados
Blast	Basic local alignment search tool
°C	Grados centígrados
CIP	Centro Internacional de la Papa
cm	Centímetros
cM	Centimorgan
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
DAS-ELISA	Doble Anticuerpo <i>Sandwich</i> – ELISA
dNTP	Desoxi ribonucleósidos tri-fosfato
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Resistencia extrema
FR	Frecuencia de recombinación
HR	Resistencia hipersensitiva
IDAHO	Universidad de Idaho
IRDye	Infrared Dye
Kv	Kilovoltio
LB	Luria-Bertoni
MAS	Selección Asistida por Marcadores
Mb	Megabase
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NASH	Hibridación de Ácidos Nucleícos
NBS	Dominio de unión a nucleótido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	picomol
PLRV	Virus del enrollamiento de la hoja de papa

PVY	Virus Y de papa
PVX	Virus X de papa
RFLP	Polimorfismo en Longitud de Fragmentos de Restricción
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SCRI	Scottish Crop Research Institute
ssp	subespecie
TE	Tris/EDTA
TIGR	The Institute for Genomic Research
U	Unidades
UV	Ultravioleta
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Microlitro

## RESUMEN

---

La resistencia extrema al virus PVY es controlada por los genes *Ry* y es efectiva contra todas las cepas a diferencia de la resistencia hipersensitiva, la cual es específica para una determinada cepa. En *Solanum tuberosum* ssp *andigena*, el responsable de esta resistencia es el gen *Ry<sub>adg</sub>* localizado en el cromosoma XI. El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar a nivel molecular la región del cromosoma XI donde se localiza el gen *Ry<sub>adg</sub>* que confiere resistencia al virus PVY con la finalidad de identificar marcadores moleculares estrechamente ligados al gen, así como el ordenamiento y la distancia de estos en esta región, y aplicar estos marcadores en la identificación de nuevas fuentes de resistencia a este virus en el germoplasma de *Solanum tuberosum* ssp *andigena*. La progenie segregante evaluada para determinar el orden y la distancia de los marcadores RySC3, M45 y M6 fue obtenida al cruzar la variedad Costanera, resistente a PVY por poseer el gen *Ry<sub>adg</sub>* en dosaje simplex, y la variedad susceptible LBr-43. Los tres marcadores evaluados segregaron en la progenie en la proporción 1:1, lo cual confirma el dosaje alélico de *Ry<sub>adg</sub>* de Costanera. De 1089 plantas evaluadas, se obtuvieron cuatro individuos recombinantes para los tres marcadores evaluados y se obtuvo que el orden más probable de estos marcadores es M6 flanqueado por RySC3 (a una distancia de 0,18 cM) y por M45 (a una distancia de 0,18 cM). La evaluación de la resistencia a PVY en los recombinantes indicó que el gen *Ry<sub>adg</sub>* se podría localizar entre los marcadores M6 y M45, o muy cercano a esta región. Al utilizar los marcadores M45 y RySC3 en una población de 251 entradas nativas de *S. tuberosum* ssp *andigena*, se encontró que solo la entrada Pisha Milpo es positiva para estos dos marcadores, y también al marcador M6. Posteriormente, se comprobó su identidad como *S. tuberosum* ssp *andigena* utilizando un marcador de cloroplasto y marcadores microsatélites. Finalmente, la evaluación en invernadero confirmó la resistencia a PVY en Pisha Milpo.

Palabras claves: PVY, *S. tuberosum* ssp *andigena*, *Ry<sub>adg</sub>*, resistencia, marcadores moleculares

## ABSTRACT

---

Extreme resistance to PVY virus is controlled by *Ry* genes and is effective against all strains in contrast to hypersensitive resistance, which is specific to a particular strain. In *Solanum tuberosum* ssp *andigena*, the responsible for this resistance is *Ry<sub>adg</sub>* gene located in the chromosome XI. This work aims to characterize at molecular level the region of chromosome XI where the gene *Ry<sub>adg</sub>*, that confers resistance to PVY, is located in order to identify molecular markers closely linked to this gen, the order and distance of these in this region and apply these markers in identifying new sources of resistance to PVY in the germplasm of *Solanum tuberosum* ssp *andigena*. Segregating progeny evaluated to determine the order and distance of the RySC3, M45 y M6 markers was obtained cross the Costanera variety, PVY resistant to possess the *Ry<sub>adg</sub>* gene in simplex dosage, and the susceptible variety LBr-43. The three markers evaluated in the progeny segregated in a 1:1 ratio, confirming the *Ry<sub>adg</sub>* allelic dosage of Costanera. Of 1089 evaluated were obtained four recombinant individuals for all three markers assessed and the most likely order of these markers is M6 flanked by RySC3 (to 0,18 cM) and M45 (to 0,18 cM). Evaluation of resistance to PVY in these recombinants indicated that the *Ry<sub>adg</sub>* could be located between M6 and M45 markers, or near of this region. By using the M45 and RySC3 markers in a population of 251 accessions of *S. tuberosum* ssp *andigena*, this work found that only the Pisha Milpo accession was positive for these markers, and also for the M6 marker. Subsequently, was confirmed their identity as *S. tuberosum* ssp *andigena* using a chloroplast marker and microsatellites. Finally, the greenhouse evaluation confirms the PVY resistance in Pisha Milpo accession.

Keywords: PVY, *S. tuberosum* ssp *andigena*, *Ry<sub>adg</sub>*, resistance, molecular markers

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante a nivel mundial después del trigo, el maíz y el arroz, y representa un gran aporte de la región andina al mundo entero (Hawkes, 1994). En el Perú, es el principal cultivo del país en superficie sembrada y representa el 25% del PBI agropecuario, siendo base de la alimentación de la zona andina y producido por 600 mil pequeñas unidades agrarias (MINAG, 2010).

Como muchos otros cultivos, la papa es susceptible a diferentes tipos de virus, entre los cuales el PLRV, PVX y PVY tienen una gran importancia por causar una degeneración de este cultivo. Actualmente, el virus Y de la papa (PVY) es considerado el virus más peligroso a nivel mundial en términos económicos, excepto en Australia (Valkonen, 2007). Esto se debe principalmente a que se transmite de manera no persistente por medio de áfidos, por lo que el uso de insecticidas para controlar su diseminación no es efectivo en general. Debido a esta problemática, los programas de mejoramiento de papa se han enfocado desde hace mucho tiempo en obtener cultivares con alto niveles de resistencia a este virus (Ross 1958; Cockerham, 1970).

La resistencia extrema es conferida por genes dominantes únicos (denominados *Ry*) que previenen la multiplicación de PVY en la etapa temprana de la infección (Barker y Harrison, 1984). Los genes *Ry* utilizados en los actuales programas de mejoramiento han sido obtenidos de entradas de papas cultivadas de *S. andigena* ssp *andigena* (*Ry<sub>adg</sub>*) (Muñoz *et al.*, 1975), o de la especie silvestre *S. stoloniferum* (*Ry<sub>sto</sub>*) procedentes de México (Hawkes, 1990). Es importante mencionar que hasta la fecha, estos dos genes aun no han sido aislados y caracterizados.

La Selección Asistida por Marcadores (MAS) basados en marcadores de DNA ligados estrechamente a los genes de resistencia ha permitido una incorporación

eficiente de éstos en líneas mejoradas (Gebhardt *et al.*, 2006). Utilizando métodos de genética molecular, los genes de resistencia *Ry<sub>adg</sub>* y *Ry<sub>sto</sub>* han sido mapeados en el cromosoma XI (Hamalainen *et al.*, 1997; Brigneti *et al.*, 1997) y se han desarrollado marcadores moleculares ligados a este gen que han sido utilizados en MAS de diferentes poblaciones de mejoramiento (Sorri *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2000).

Uno de los principales objetivos del Centro Internacional de la Papa (CIP) ha sido la obtención de cultivares con resistencia extrema a PVY a partir de las fuentes de resistencia ya reportadas así como la identificación de nuevas fuentes de resistencia presente en papas nativas y silvestres que sean efectivas contra todas las cepas de este virus.

En este sentido, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el orden de los marcadores ligados al gen *Ry<sub>adg</sub>* del cromosoma XI como etapa previa a la identificación de este gen y de identificar nuevas fuentes de resistencia en el germoplasma de *S. tuberosum ssp andigena*.

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1. Las papas cultivadas

#### 2.1.1. Posición taxonómica (Hawkes, 1992)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: Solanum

Sección: Petota

Subsección: Potatoe

Serie: XVI Tuberosa Hawkes

Especie: *Solanum tuberosum* L.

#### 2.1.2. Generalidades

El género *Solanum* contiene alrededor de 1000 especies. Se distribuye alrededor de todo el mundo con una fuerte concentración de diversidad de especies en América del Sur y Central en primera instancia, y Australia en segunda instancia.

Además de *S. tuberosum*, son reconocidas otras ocho especies de papa cultivadas y más de 230 especies silvestres de papa, mientras que el resto de los miembros del género se encuentra conformado de especies no tuberizantes, tales como *S. nigrum* y algunas hierbas espinosas y arbustivas (Hawkes, 1992). Las especies productoras de tubérculos son exclusivas del continente americano y algunas son de considerable interés para los mejoradores de papa, debido a su resistencia a plagas y patógenos, así como su adaptación a ambientes extremos.

La papa cultivada es originaria de los Andes de Perú y Bolivia y es una especie autotetraploide ( $2n = 4x = 48$ ) con una alta heterocigosidad y se divide en 2 subespecies: *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* y *Solanum tuberosum* ssp *andigena* (Hawkes, 1994).

### **2.1.3. *Solanum tuberosum* ssp *andigena***

Es la más primitiva de las dos subespecies y se originó en los Andes como un híbrido anfiploide de *S. stenotomun* y *S. sparsipilium* (Crib y Hawkes, 1986; Howard, 1973; Woodcock, 1975). Esta subespecie puede ser distinguida por su hábitat alto, con numerosos y elongados tallos, foliolos más estrechos y numerosos. Los tubérculos se producen a altas altitudes (sobre los 2000 msnm) solo bajo condiciones de días cortos. Se encuentra en los Andes de Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia, noreste de Argentina, y también de manera escasa en Guatemala y México (Hawkes, 1956).

## **2.2. El virus Y de la papa**

### **2.2.1. Generalidades**

El virus Y de la papa (PVY) es un miembro del género Potyvirus (de Bokx y Huttinga, 1981) y es uno de los virus más importantes que afecta al cultivo de la papa. En el Perú, se reportó por primera vez la presencia de PVY en 1954 (Silberschmidt, 1954).

El PVY es activamente diseminado por áfidos (a excepción de la cepa PVY<sup>C</sup>) de forma no persistente ya que la adquisición e inoculación de las partículas virales desde una planta infectada a una sana ocurre en un período muy corto de tiempo y causa una gran reducción en el rendimiento de los cultivares comerciales susceptibles.

Los síntomas son variables de acuerdo a la variante involucrada, al cultivar de papa y a las condiciones de crecimiento (Bagnal, 1952). Los genotipos susceptibles reaccionan con una necrosis de leve a severa que puede provocar la



caída de las hojas viejas. En la mayoría de los cultivares de papa, el PVY causa caída de las hojas viejas, listado necrótico en los tallos en el primer año de infección y mosaico severo en los años subsiguientes (Johansen, 1957).

El PVY de papa es también un importante patógeno de otros cultivos de Solanáceas que incluyen al pimiento (*Capsicum* spp.), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*); además de algunas plantas ornamentales (Singh *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Variabilidad**

Se han reportado cuatro grupos de cepas de PVY (Fernández-Northcote, 1980; Singh *et al.*, 2008): a) la PVY<sup>O</sup>, la cepa más común y comprende las variantes transmitidas por áfidos y produce el aclaramiento de nervaduras y mosaico en tabaco; b) la PVY<sup>C</sup>, no se transmite por áfidos y produce mosaico en tabaco; c) PVY<sup>N</sup>, que produce necrosis venal en tabaco y es transmitido por áfidos; d) PVY<sup>NTN</sup>, que es una variante reciente y produce manchas necróticas en forma de anillo en los tubérculos.

Las cepas de PVY<sup>O</sup> son de distribución mundial, en tanto que PVY<sup>C</sup> está presente en Australia, Nueva Zelanda, India, Europa, Sudáfrica, Sudamérica y Norte América. La cepa PVY<sup>N</sup> ocurre en Europa, África, Nueva Zelanda, Norte América y Sudamérica, mientras que PVY<sup>NTN</sup> ha sido reportada en Europa, Nueva Zelanda, Medio Oriente, Norte América y Japón (Jones *et al.*, 2003; Mulder y Turkensteen, 2004).

### **2.2.3. Importancia económica y ambiental**

PVY puede causar pérdidas en la producción de hasta 80% en variedades susceptibles o en co-infecciones con otros virus (Valkonen *et al.*, 1998) y puede perpetuarse mediante el uso de tubérculos como semilla. Las pérdidas pueden ser por disminución de la producción, disminución de la cosecha de semillas y daños al tubérculo.

El uso de insecticidas para eliminar las poblaciones de áfidos no es efectivo y costoso. Además, hay una creciente preocupación sobre los efectos dañinos sobre el ambiente, los residuos en los tubérculos y la salud de los consumidores; el incremento de resistencia de los áfidos a insecticidas es otro factor indeseable del uso de los insecticidas (Thieme y Thieme, 2005).

## **2.3. Resistencia a PVY en papa**

### **2.3.1. Generalidades**

En papa, se han reportado dos tipos de resistencia a PVY, la resistencia hipersensitiva (HR) y la resistencia extrema (ER), siendo esta última la más efectiva y de más amplio espectro (Valkonen *et al.*, 1996). La resistencia extrema a PVY es conferida por genes monogénicos dominantes denominados *Ry* (Cockerham, 1970). Este tipo de resistencia a PVY ha sido reportada en algunas entradas de *Solanum tuberosum* ssp *andigena* (*Ry<sub>adg</sub>*) (Muñoz *et al.*, 1975), *Solanum stoloniferum* (*Ry<sub>sto</sub>*) (Cockerham, 1970), *Solanum chacoense* (*Ry<sub>chc</sub>*) y *Solanum tuberosum* (Ross, 1952).

La región del cromosoma XI donde se encuentran *Ry<sub>adg</sub>* y *Ry<sub>sto</sub>* se caracteriza por ser abundante en regiones repetitivas y por la presencia de varios genes involucrados en la resistencia a diferentes patógenos (genes R) (Gebhardt y Valkonen, 2001). Por estas razones, la identificación de los genes responsables de la resistencia a un determinado patógeno es muy difícil.

### **2.3.2. Resistencia en *S. tuberosum* ssp *andigena***

En *S. tuberosum* ssp *andigena*, el gen *Ry<sub>adg</sub>* está localizado en el brazo corto del cromosoma XI (Hamalainen *et al.*, 1997). Este trabajo utilizó a la variedad mejorada 2x(V-2)7 que poseía el gen *Ry<sub>adg</sub>* proveniente de varios cruzamientos. Este gen es de gran importancia porque confiere un fenotipo de resistencia estable contra todas las cepas de PVY (Le Romanecer y Nedellec, 1997; Mihovilovich *et al.*, 1997). Además, *Ry<sub>adg</sub>* es epistático sobre el gen *Ny<sub>adg</sub>* (gen de

hipersensibilidad), por lo que los genotipos que posean ambos genes solo expresan la respuesta de extrema resistencia y no la de hipersensibilidad (Valkonen *et al.*, 1994).

Hamalainen *et al.* (1998) identificaron dos fragmentos genómicos, ligados estrechamente a *Ry<sub>adg</sub>*, denominados ADG1 y ADG2. La secuencia de ADG2 representa un dominio de unión a nucleótido (NBS) y es estructuralmente similar al gen N que confiere resistencia hipersensible al virus del mosaico del tabaco en *Nicotiana* sp (Sorri *et al.*, 1999). Al comparar las secuencias de ADG2 entre 2x(V-2)7 (línea resistente a PVY) y 84.194.30 (línea susceptible a PVY), las cuales fueron utilizadas como progenitores en la obtención de la población donde se identificó *Ry<sub>adg</sub>*, se observó que difieren en 11 nucleótidos (Sorri *et al.*, 1999). Basándose en estas diferencias, Kasai *et al.* (2000) desarrolló el marcador denominado RySC3. Este marcador ha sido utilizado en varios programas de mejoramiento para la detección de resistencia extrema a PVY (Shiranita *et al.*, 1999; Gadum *et al.*, 2003; Rizza *et al.*, 2006).

El gen de resistencia *Ry<sub>adg</sub>* de la entrada 2x(V-2)7 ha sido la fuente principal de resistencia usada en el programa de mejoramiento para resistencia a PVY del Centro Internacional de la Papa (CIP) (Mihovilovich, 1996), en donde se han desarrollaron las variedades Costanera y Tacna, las cuales están adaptadas a las áridas tierras de la costa peruana y presentan resistencia extrema a PVY.

### **2.3.3. Resistencia en *S. stoloniferum***

En *S. stoloniferum*, Cockerham (1970) sugiere la presencia de dos loci responsables de la resistencia a PVY. Posteriormente, Brigneti *et al.*, (1997) localizaron el gen *Ry<sub>sto</sub>* en el cromosoma XI, en una posición muy cercana a *Ry<sub>adg</sub>*, mientras que los estudios realizados por Flis *et al.* (2005) y Son *et al.* (2005) reportaron la presencia del gen *Ry<sub>sto</sub>* en el cromosoma XII en dos posiciones distintas pero muy cercanas (*Ry<sub>sto</sub>* y *Ry-f<sub>sto</sub>*).

En el caso de  $Ry_{sto}$  del cromosoma XI, utilizando la variedad I-1039 se identificaron varios marcadores fuertemente ligados a  $Ry_{sto}$ , denominados M5, M6, M17, M33 y M45 (Brigneti *et al.*, 1997; Mestre *et al.*, 2000).

Con respecto a los 2 genes  $Ry_{sto}$  presentes en el cromosoma XII, Son *et al.*, (2005) identificaron un marcador microsatélite (STM0003) y un marcador AFLP (U5-2) fuertemente ligados al gen  $Ry_{sto}$  mientras que en el caso del gen  $Ry-f_{sto}$  se han identificado dos marcadores RFLP: GP122<sub>564</sub> y GP122<sub>718</sub> (Flis *et al.*, 2005; Witek *et al.*, 2006).

### 3. HIPÓTESIS

---

Existen marcadores moleculares estrechamente ligados al locus *Ry* del cromosoma XI que se encuentran en un determinado orden que permitirían identificar nuevas fuentes de resistencia al virus PVY.

### 4. OBJETIVOS

---

#### General

- Caracterizar a nivel molecular y genético los marcadores moleculares ligados al gen *Ry<sub>adg</sub>*.

#### Específicos

1. Validar el uso de los marcadores moleculares en la determinación del dosaje alélico en una población segregante.
2. Obtener individuos recombinantes para los marcadores RySC3, M45 y M6 en una población de individuos resultante del cruce entre Costanera y LBr-43.
3. Determinar el orden de los marcadores moleculares ligados al gen *Ry* del cromosoma XI.
4. Determinar la posición del gen responsable de la resistencia extrema al virus PVY en el cromosoma XI de *S. tuberosum* ssp *andigena*.
5. Identificar nuevas fuentes de resistencia a PVY en el germoplasma de *S. tuberosum* ssp *andigena*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada (ABL) del Centro Internacional de la Papa (CIP).

### 5.1. MATERIALES

#### 5.1.1. Población para identificar recombinantes

La población segregante de papa evaluada en el presente trabajo comprendió a 1089 individuos provenientes del cruce entre *Solanum tuberosum* variedad Costanera (CIP 379706.27) y el genotipo LBr-43 (CIP 387170.9) (figura 1). Ambos parentales fueron tetraploides.



**Figura 1.** Plántulas de la progenie Costanera x LBr-43 crecidas en invernadero a 24°C y 90 % de humedad relativa.

La variedad Costanera fue el progenitor femenino y poseía el gen de resistencia a PVY proveniente de *S. tuberosum* ssp *andigena* ( $Ry_{adg}$ ) en dosaje *simplex* ( $Ryryryry$ ), mientras que la variedad LBr-43 fue el progenitor masculino y no poseía el gen de resistencia  $Ry_{adg}$  ( $ryryryry$ ).

### **5.1.2. Población para identificar nuevas fuentes de resistencia**

Se utilizó el DNA de 251 entradas de *S. tuberosum* ssp *andigena* de la Colección de DNA del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP (anexo 1).

## **5.2. MÉTODOS**

### **5.2.1. Identificación de plantas recombinantes**

Se procedió a determinar el orden de los marcadores RySC3, M45 y M6 en una población segregante, resultante del cruce entre las variedades Costanera (resistente a PVY) y LBr-43 (susceptible a PVY), mediante la identificación de individuos recombinantes para los marcadores evaluados. Posteriormente, se realizó un tamizado en invernadero para determinar si los individuos recombinantes eran resistentes o susceptibles a PVY.

#### **5.2.1.1. Extracción del DNA**

El DNA genómico de los individuos de la población Costanera x LBr-43 fue obtenido utilizando el Extract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma<sup>®</sup>), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante:

- Se obtuvo un disco foliar con un diámetro de 0,5 a 1 cm por cada planta.
- Se colocaron los discos foliares de cada planta en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
- Se agregó en cada tubo 100 µL de la Solución de Extracción. Se mezcló por un breve instante asegurándose que los discos estén cubiertos por la solución.
- Se incubaron a 95°C por 10 minutos.

- Luego, se agregaron 100  $\mu$ L de la Solución de Dilución y se mezcló.
- Se guardaron los tubos de microcentrífuga a  $-4^{\circ}\text{C}$ . No fue necesario remover el disco de la hoja.

Para efectos del presente estudio, debido a que se trabajó con una gran cantidad de muestras, en vez de colocar los discos foliares en tubos de microcentrífuga, se utilizaron cajas de dilución de 96 pocillos para tener una mayor comodidad y rapidez en el procesamiento de las muestras (figura 2).



**Figura 2.** Colecta de las muestras de hojas de las plántulas de la población Costanera x LBr-43 en cajas de dilución de 96 pocillos.

#### 5.2.1.2. Amplificación de marcadores moleculares

Se utilizaron los marcadores ligados al locus Ry del cromosoma XI de *S. tuberosum* ssp *andigena* y *S. stoloniferum* desarrollados por Brigneti *et al.* (1997) y Kasai *et al.* (2001), respectivamente (tabla 1).



**Tabla 1.** Lista de iniciadores específicos ligados al gen *Ry* del cromosoma XI utilizados en el presente estudio

Marcador	Tipo de <i>Ry</i>	Iniciador	Secuencia (5' — 3')	Referencia
RySC3	<i>Ry<sub>adg</sub></i>	3.3.3 S	ATACACTCATCTAAATTTGATGG	Kasai <i>et al.</i> , 2001
		ADG23R	AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	
M6	<i>Ry<sub>sto</sub></i>	M6 Rsa	TCCGAAATGTTTGGGCTGACATC	Brigneti <i>et al.</i> , 1997
		M6 Taq	AAGGGATCCAAAAAGGTGGTTCA	
M45	<i>Ry<sub>sto</sub></i>	M45-m	CCTAGTTTCTGAGCATGTAATTC	Brigneti <i>et al.</i> , 1997
		M45-p	TGCAGCTATTCAAAACACATAAGG	

En una placa para PCR de 96 pocillos se mezclaron los reactivos por muestra para cada marcador según las condiciones de la tabla 2:

**Tabla 2.** Concentración final de los reactivos utilizados en la amplificación por PCR de los marcadores ligados al gen *Ry* del cromosoma XI

Reactivo	Marcadores		
	RYSC3	M6	M45
Buffer 10X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM	0,1 mM
Iniciador F	0,2 uM	0,2 uM	0,1 uM
Iniciador R	0,2 uM	0,2 uM	0,1 uM
<i>Taq</i> Polimerasa	0,2 U	0,2 U	0,2 U
DNA genómico	2 µL	2 µL	2 µL
Se completó hasta 20 µL con agua libre de nucleasas			

El protocolo de PCR para cada marcador se indica en la tabla 3 y se utilizó un termociclador MJ Research PTC-200.

**Tabla 3.** Protocolo de PCR de los marcadores ligados al gen *Ry* del cromosoma XI

<b>Paso</b>	<b>RYSC3</b>	<b>M6</b>	<b>M45</b>
1	93°C x 9'	94°C x 1'	94°C x 1'
2	94°C x 45"	94°C x 20"	94°C x 20"
3	60°C x 45"	55°C x 20"	62°C x 30"
4	72°C x 1'	72°C x 1'30"	72°C x 30"
5	Regresar al paso 2 34 veces	Regresar al paso 2 34 veces	Regresar al paso 2 34 veces
6	72°C x 5'	72°C x 7'	72°C x 10'
7	4°C por siempre	4°C por siempre	4°C por siempre
8	Fin	Fin	Fin

En el caso del marcador M6, para obtener el polimorfismo ligado a la resistencia o susceptibilidad a PVY, los productos de amplificación fueron digeridos con la enzima de restricción *RsaI* mediante una incubación a 37°C por 1 hora.

Luego, se agregó 2 µL de tampón de carga SALB 10X a los amplificados obtenidos y los productos de la digestión con *RsaI*, y fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución tampón TBE 1X. Los productos de amplificación (bandas) se visualizaron en un transiluminador UV EpiChemi a

254 nm y las imágenes digitales fueron procesadas mediante el programa Paint Shop Pro 7,0<sup>®</sup>.

#### 5.2.1.3.Registro de datos

En el caso de los marcadores RYSC3 y M45, los alelos dominantes ligados al gen Ry fueron los fragmentos de 321 y 495 pb, respectivamente. En el caso del marcador M6, el alelo dominante presenta bandas de 800 y 300 pb, mientras que el alelo susceptible tiene las bandas de 500 y 600 pb y el alelo neutro tiene una sola banda de 1100 pb. Para el registro de datos solo se consideró la presencia como 1 y la ausencia como 0 de los alelos dominantes. Posteriormente, se generó una base de datos utilizando el programa Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003.

#### 5.2.1.4.Confirmación de los recombinantes

Los individuos recombinantes son aquellos que sólo tienen alelos dominantes para uno o dos marcadores como máximo, de los tres evaluados. Los individuos identificados fueron confirmados con una nueva extracción de DNA a partir de hojas de plántulas *in vitro* mantenidas en un invernadero; el método de extracción fue el de CTAB a mediana escala (CIP, 2004). El protocolo consistió de los siguientes pasos:

- Se pesaron 4 gramos de plántulas *in vitro*.
- Se trituraron en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
- Se transfirieron estos polvos a un tubo Falcon<sup>®</sup> de 50 mL que contenían 20 mL del tampón de extracción CTAB y 200 µL de β-mercaptoetanol.
- El tubo Falcón<sup>®</sup> se incubó en agitación continua a 65°C en baño María durante 20 min. Se enfrió a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Se agregó igual volumen de clorofomo:alcohol isoamílico (24:1). Se invirtió suavemente el tubo continuamente durante 5 minutos.
- Se centrifugó a 4000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf<sup>®</sup> durante 20 minutos a 4°C.

- Se transfirió la fase acuosa a un tubo de 50 mL.
- Se agregó igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló invirtiendo suavemente el tubo durante 5 minutos.
- Se centrifugó a 4000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf® durante 20 minutos a 4°C.
- Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Falcon® de 50 mL conteniendo 2/3 del volumen (15 mL aproximadamente) de isopropanol frío. Se invirtió suavemente el tubo.
- Se dejó precipitar el DNA por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se recogió la “medusa” de DNA con una pipeta Pasteur.
- Se transfirió la “medusa” a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL conteniendo 300 µL de solución de lavado 1. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se transfirió la “medusa” a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 300 µL de solución de Lavado 2. Se dejó reposando 2 segundos.
- Se transfirió la “medusa” a un tubo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos con la tapa abierta.
- Se disolvió en 500 µL de solución tampón TE.
- Se añadió de 5 a 10 µL de RNasa libre de DNasa (10 mg/mL). Se incubó por 60 minutos a 37°C.
- Se almacenó a 4°C para uso inmediato o a –20°C para periodos largos.

El DNA obtenido, se usó posteriormente para obtener nuevos productos de amplificación de los marcadores RYSC3, M45 y M6 con la metodología descrita previamente.

#### 5.2.1.5. Prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ )

Para confirmar la segregación 1:1 de los alelos dominantes en los individuos de la población debido al dosaje simplex (presencia de una copia) del gen *Ry<sub>adg</sub>* de la variedad Costanera (*Ryryryry*) y la condición nuliplex (ausencia de copias) de LBr-43 (*ryryryry*), se utilizó la prueba Chi-cuadrado.

El Chi-cuadrado es una prueba estadística que convierte las desviaciones de los valores esperados en la probabilidad de que estas desigualdades ocurran por azar. Además, toma en cuenta el tamaño de la muestra y el número de variables (grados de libertad) (Stansfield, 1992).

Se estableció la hipótesis nula, la cual representa los resultados esperados que no pueden ser explicados sólo por el azar. En este caso la hipótesis nula fue: el alelo dominante ligado al locus *Ry<sub>adg</sub>* (M6, RYSC3 o M45) segrega en proporción 1:1, por lo que se confirma la conformación simplex del marcador.

Para calcular el valor  $\chi^2$  se utilizó la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}.$$

Donde el Chi-cuadrado es la sumatoria de las desviaciones ( $O - E$ ) elevada al cuadrado y dividido entre  $E$ . El valor observado se representa con  $O$ , el valor esperado con  $E$  y con  $k$  el número de clases.

Usando el valor del Chi-cuadrado se calculó la probabilidad  $p$  en una tabla de distribución Chi-cuadrado; tomando en cuenta el número de grados de libertad ( $n - 1$ ). El valor  $p$  representa la probabilidad de obtener una desviación igual o mayor a la obtenida en los resultados debido solamente al azar (Gardner, 1971). De acuerdo al valor de  $p$ , se acepta o se rechaza la hipótesis nula. Generalmente se establece un valor de  $p \leq 0.05$  para rechazar la hipótesis nula y se afirma que dichos resultados son significativos.

#### 5.2.1.6. Cálculo de la distancia genética entre los marcadores

Se calculó la distancia genética entre los marcadores M6, RYSC3 y M45 en la población Costanera x LBr-43 considerando los genotipos de tipo parental (presencia o ausencia de los tres marcadores) y los genotipos recombinantes (presencia de dos marcadores como máximo). En este tipo de cruzamiento se

espera que los genotipos parentales sean más frecuentes que los genotipos recombinantes.

El orden de los marcadores se determinó probando diferentes ordenamientos de los tres marcadores, de tal modo que el orden sea el adecuado para producir los recombinantes simples y dobles.

Posteriormente, se determinó la distancia genética entre cada par de marcadores calculando la frecuencia de recombinación (FR). Esta distancia es expresada en centimorgan (cM), por lo que 1 cM representa la distancia entre un par de marcadores para los que solo uno de 100 productos de la meiosis es un recombinante. Así una FR de 0,01 (ó 1%) es definida como una distancia de 1 cM (Suzuki *et al.*, 1986). Una FR menor a 0,5 (ó 50%) indica que dos marcadores pertenecen al mismo grupo de ligamiento (Cubero, 2003).

$$FR = \frac{\text{Número de individuos recombinantes para los marcadores a y b}}{\text{Número total de la población}} \times 100\%$$

#### 5.2.1.7. Tamizado para la resistencia a PVY

Mediante la inoculación artificial de PVY en invernadero se evaluó la resistencia a PVY en la variedad Costanera, la variedad LBr-43 y los individuos recombinantes identificados.

Se inocularon 6 plantas por cada genotipo. Tres plantas fueron inoculadas mecánicamente y las restantes fueron inoculadas por injerto. El tamizado se realizó bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, estas fueron de 24°C y 90 % de humedad relativa, respectivamente y se llevó a cabo durante los meses de Enero y Febrero del 2009. La inoculación se efectuó cuando las plantas tenían aproximadamente 1 mes de crecimiento y se utilizó la cepa PVY<sup>O</sup> mantenida en *Nicotiana occidentales*, la cual induce un mosaico severo y necrosis (CIP, 2006).

La inoculación mecánica y la inoculación por injerto se realizaron siguiendo el protocolo descrito en CIP (2006). La evaluación visual de los síntomas, la toma de fotografías y toma de muestra para pruebas de detección del virus PVY<sup>O</sup> se realizaron entre los 25 a 30 días después de la inoculación.

Para una detección más sensible del virus PVY<sup>O</sup> en las plantas inoculadas se utilizó la prueba serológica DAS-ELISA (doble anticuerpo sandwich – ELISA) y la prueba NASH (hibridización de ácidos nucleicos). La técnica DAS-ELISA permite la detección del virus mediante la unión antígeno: anticuerpo y la técnica NASH se basa en la hibridización de una sonda de DNA o RNA específica del virus a una cadena simple de DNA de la muestra. Estas dos pruebas fueron realizadas como un servicio en el Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Protección de Cultivos del CIP según el manual de Técnicas en Virología de plantas del CIP (CIP, 1997).

#### 5.2.1.8. Mantenimiento y propagación de los recombinantes

Los recombinantes de la población Costanera x LBr-43 identificados fueron transplantados a macetas y mantenidos bajo condiciones de invernadero. Para estudios posteriores, las plantas fueron propagadas mediante esquejes en discos de Jiffy-7<sup>®</sup>, que contienen un medio de enraizamiento especial, y tratadas con hormona Rootone<sup>®</sup> para su enraizamiento.

#### 5.2.2. Identificación de nuevas fuentes de resistencia a PVY

Se procedió a identificar nuevas fuentes de resistencia a PVY, diferentes a las ya reportadas en la literatura, utilizando los marcadores RySC3 y M45 en la Colección de DNA del ABL de papas nativas de *S. tuberosum* ssp *andigena*. Se realizó la confirmación de la amplificación de los marcadores evaluados, así como la del marcador M6, con una nueva extracción de DNA a partir de plántulas *in vitro* de los individuos identificados. Posteriormente, también se realizó la comprobación de la identidad de estos individuos como *S. tuberosum* ssp *andigena* utilizando un marcador de cloroplasto. Finalmente, se procedió a

comprobar si estos individuos identificados son fenotípicamente resistentes a PVY.

#### 5.2.2.1. Amplificación de marcadores moleculares

Se amplificaron, mediante PCR, los marcadores RySC3 y M45 en el DNA de las 251 entradas de *S. tuberosum* ssp *andigena* provenientes de la Colección de DNA del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP utilizando las condiciones estandarizadas previamente. Para evaluar la calidad y el estado del DNA, en primer lugar se realizó la amplificación del marcador M45. Asimismo, se utilizó a las entradas de Costanera y LBr-43 como control positivo y negativo, respectivamente.

Se agregó 2 µL de tampón de carga SALB 10X a los amplificados obtenidos y éstos fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución tampón TBE 1X. La visualización y registro de datos se procedió de la misma manera a como se ha descrito anteriormente.

#### 5.2.2.2. Confirmación de los individuos positivos

Los individuos identificados como positivos fueron confirmados con una nueva extracción de DNA a partir de hojas de plántulas mantenidas *in vitro* en el Banco de Germoplasma del CIP. Esto se realizó con la finalidad de asegurar la presencia de los marcadores evaluados en estas accesiones y eliminar cualquier duda de contaminación de este material, debido a que procede de una colección de diferentes proyectos realizados en el ABL del CIP. En la extracción de DNA se utilizó el método de CTAB a mediana escala y el DNA extraído se utilizó para amplificar los marcadores RYSC3 y M45 y confirmar de esta manera los resultados obtenidos. También se utilizó el marcador M6.

#### 5.2.2.3. Comprobación de la identidad de las entradas positivas

Se realizó la amplificación de las muestras positivas, para comprobar que son efectivamente *S. tuberosum* ssp *andigena*, con un marcador molecular de



cloroplasto desarrollado por Hosaka *et al.* (2002) que permite obtener un amplificado de 450 bp del genoma del cloroplasto de papa y que permite diferenciar *S. tuberosum* ssp *andigena* de *S. tuberosum* ssp *tuberosum*, por la presencia de una delección de 250 bp en este último. La secuencia del iniciador Fw es 5'-GGAGGGGTTTTCTTGTTG-3' y la secuencia del iniciador Rv es 5'-AAGTTTACTCACGGCAATCG-3'.

Las condiciones de PCR fueron realizadas en un volumen de 10 µL y consistió de 50 ng de DNA genómico, 400 pM de cada iniciador, buffer de PCR 1X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 0,2 unidades de *Taq* DNA polimerasa. El PCR fue realizado con un ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C y 45 segundos a 72°C, y finalizó en un ciclo de 5 minutos a 72°C. Los amplificados fueron corridos en electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados con tinción en bromuro de etidio en un transiluminador UV.

Asimismo, se amplificaron 24 marcadores microsatélites usando el Potato Genotyping Identification Kit desarrollado por Ghislain *et al.* (2009) (tabla 4), del DNA de los individuos positivos proveniente de la colección de DNA y de la nueva extracción para comprobar de que se tratan de las mismas entradas al comparar los perfiles alélicos para cada marcador.

Se realizaron las amplificaciones por PCR en un volumen total de 10 µL, conteniendo 1X de *buffer 5X colorless GoTaq* (PROMEGA®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 10 pM de iniciador M13 forward marcado con IRDye 700-800 (LI-COR), 0,2 µM de iniciador forward SSR con cola M13 (IDT), 0,2 µM de iniciador reverse SSR (IDT), 1U *Taq* polimerasa y 5 ng/ml de DNA genómico.

Los fragmentos obtenidos fueron corridos en geles de poliacrilamida al 6,5% y visualizados en un Secuenciador LI-COR 4300 (LI-COR). Los datos fueron obtenidos y analizados utilizando el programa SAGA MX (LI-COR).

**Tabla 4.** Marcadores microsatélites que componen el Potato Genotyping Identification Kit

Nombre	Motivo	Fuente	T° ann.	Tamaño	# Alelos	PIC	Cromosoma
STM5127	(TCT) <sub>5</sub>	SCRI	55	248 - 291	16	0.852	I
STG0016	(AGA) <sub>8</sub>	TIGR	55	137 - 174	14	0.769	I
STM1064	(TA) <sub>12</sub> ·(TG) <sub>4</sub> GT (TG) <sub>5</sub>	SCRI	55	201 - 213	8	0.562	II
STM5114	(ACC) <sub>7</sub>	SCRI	60	299 - 322	11	0.692	II
STM1053	(TA) <sub>4</sub> (ATC) <sub>5</sub>	SCRI	53	170 - 196	10	0.689	III
STG0010	(TG) <sub>6</sub>	TIGR	60	175 - 192	8	0.679	III
STI0001	(AAT) <sub>n</sub>	IDAHO	60	194 - 215	8	0.682	IV
STI0012	(ATT) <sub>n</sub>	IDAHO	56	183 - 234	9	0.790	IV
STPoAc58	(TA) <sub>13</sub>	SCRI	55	243 - 263	9	0.735	V
STI0032	(GGA) <sub>n</sub>	IDAHO	61	127 - 148	8	0.747	V
STM0019	(AT) <sub>7</sub> (GT) <sub>10</sub> (AT) <sub>4</sub> (GT) <sub>5</sub> (GC) <sub>4</sub> (GT) <sub>4</sub>	SCRI	48	-	37	0.832	VI
STI0004	(AAG) <sub>n</sub>	IDAHO	60	83 - 126	10	0.683	VI
STM0031	(AC) <sub>5</sub> ... (AC) <sub>3</sub> (GCAC) (AC) <sub>2</sub> (GCAC) <sub>2</sub>	SCRI	55	161 - 211	14	0.731	VII
STI0033	(AGG) <sub>n</sub>	IDAHO	61	131 - 155	8	0.508	VII
STM1104	(TCT) <sub>5</sub>	SCRI	53	-	14	0.884	VIII
STI0003	(ACC) <sub>n</sub>	IDAHO	60	137 - 188	17	0.747	VIII
STM1052	(AT) <sub>14</sub> GT (AT) <sub>4</sub> (GT) <sub>6</sub>	SCRI	50	-	17	0.839	IX
STI0014	(TGG) <sub>n</sub> (AGG) <sub>n</sub>	IDAHO	54	127 - 154	8	0.708	IX
STM1106	(ATT) <sub>13</sub>	SCRI	55	-	15	0.824	X
STG0025	(AAAC) <sub>5</sub>	TIGR	56	208 - 223	7	0.529	X
STM0037	(TC) <sub>5</sub> (AC) <sub>6</sub> AA (AC) <sub>7</sub> (AT) <sub>4</sub>	SCRI	50	-	18	0.775	XI
STG0001	(CT) <sub>10</sub>	TIGR	57	120 - 170	15	0.690	XI
STM5121	(TGT) <sub>5</sub>	SCRI	48	300 - 309	7	0.719	XII
STI0030	(ATT) <sub>n</sub>	IDAHO	58	94 - 137	15	0.809	XII

#### 5.2.2.4. Clonamiento de los amplificados

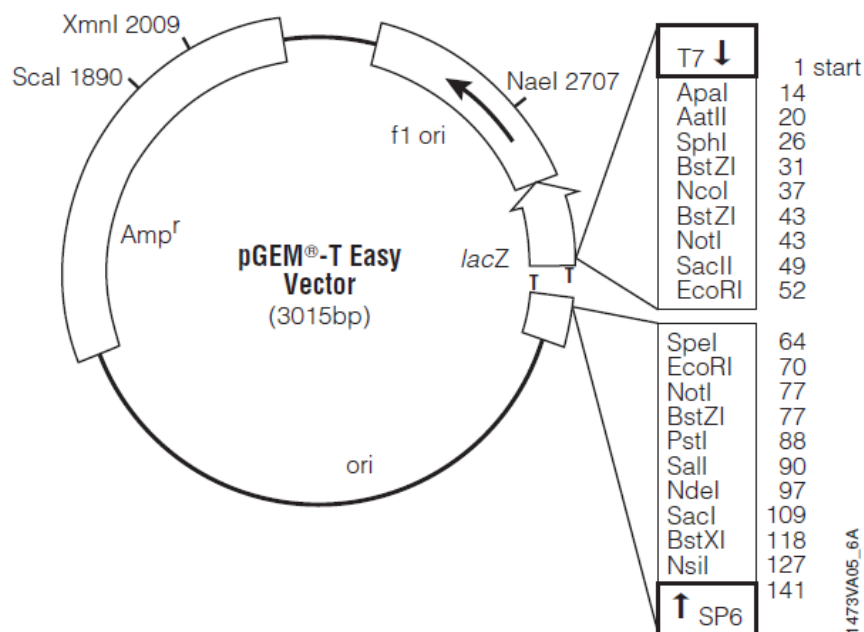
Los productos de PCR obtenidos con los marcadores RYSC3, M45 y M6 fueron aislados de un gel de agarosa al 1% en solución de amortiguamiento TBE 1X utilizando el *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Se cortó a banda a partir del gel de agarosa.
- Se agregó un volumen equivalente de Solución de Unión a Membrana.
- Se incubó a 65°C por 10 minutos para disolver el gel.
- Se transfirió la solución a la Minicolumna SV que estaba insertada a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
- Se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf®. Se descartó la solución contenida en el tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

- Se agregó 200  $\mu$ L de Solución de Lavado y se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga Eppendorf® por 10 minutos.
- Se colocó la Minicolumna SV a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se agregó 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.
- Se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga Eppendorf® por 10 minutos.
- Se almacenó a 4°C.

Posteriormente, los fragmentos purificados fueron clonados utilizando el *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Los productos purificados previamente fueron cuantificados en un gel de agarosa al 1%.
- Cada producto fue ligado en el vector *pGEM®-T Easy* (figura 3) mezclando los reactivos de la tabla 5 en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.



**Figura 3.** Mapa del vector *pGEM®-T Easy*. Se muestran los sitios de restricción y la posición de los iniciadores universales T7 y SP6.

**Tabla 5.** Volumen de los reactivos utilizados en la ligación de los productos de PCR en el vector pGEM

Reactivo	1 reacción (µL)
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5,0
pGEM-T Easy Vector (50ng)	1,0
PCR product	2,0
T4 DNA Ligase (3 unidades/µL)	1,0
Agua libre de nucleasas	1,0

- Se incubó a 4°C por toda la noche.
- Al día siguiente, se centrifugó brevemente los tubos de microcentrífuga de 1.5 mL que contenían las reacciones de ligación y se colocó en hielo.
- Al mismo tiempo, se colocó en hielo un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que contenía 50 µL de *E. coli* electrocompetentes.
- Se mezcló 2 µL de la reacción de ligación con 8 µL de agua libre de nucleasas.
- Se agregó los 10 µL de la reacción de ligación al tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contiene las *E. coli* electrocompetentes y se mezcló brevemente.
- Se trasladó toda la mezcla a una celda de transformación (BIORAD®) que fue previamente mantenida en hielo.
- Se colocó la celda conteniendo la mezcla en el carril de electroporación del Gene Pulser (BIORAD®) y se aplicó 2,5 kv por 3-4 segundos.
- Se adicionó inmediatamente 1 mL de medio SOC a la cubeta y se mezcló brevemente con las células electroporadas.
- Se transfirió todo el contenido a un tubo Falcon de 50 mL y se incubó a 37°C por 2 horas.
- Se sembró 200 µL de la suspensión en una placa de medio LB agar con ampicilina (100 µg/mL) a la cual se le había agregado previamente X-Gal e IPTG.
- Se incubó a 37°C por toda la noche.
- Se revisó al día siguiente las placas de cultivo con las *E. coli* transformadas y se seleccionaron los clones positivos.

#### 5.2.2.5. Obtención de DNA plasmídico

Se extrajo el DNA plasmídico recombinante a partir de las colonias obtenidas en la etapa previa. Las colonias fueron sembradas en 5 mL de medio LB con ampicilina y crecidas a 37°C por toda la noche. Se empleó el kit de extracción *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega®).

De las bacterias mencionadas anteriormente cultivadas en agar LB, se aisló una colonia que fue inoculada en un tubo con 6 mL de medio LB líquido con 100 ppm de ampicilina. Fue incubado a 28°C por 48 horas en agitación constante a 200 rpm. Transcurrido este tiempo, el cultivo bacteriano se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se centrifugó a 12000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf® durante 5 minutos, y luego se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió 3 veces para así obtener toda la masa celular bacteriana.

El primer paso, fue el lisado celular. El precipitado o pellet se resuspendió en 250 µL de Solución de Resuspensión y luego se adicionó 250 µL de Solución de Lisis. Se mezcló 4 veces por inversión y después se agregó 10 µL de Proteasa Alcalina, para de nuevo mezclarlo 4 veces por inversión, y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó a 13200 rpm en una microcentrífuga Eppendorf® durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El segundo paso es la fijación del plásmido. Se insertó la minicolumna del kit en un tubo de colección y el sobrenadante obtenido en el paso anterior fue colectado sobre la mini columna. Se centrifugó a 13200 rpm durante un minuto a temperatura ambiente, se descartó el flujo y se reinsertó un nuevo tubo de colección a la minicolumna.

Para el lavado, se adicionó 750 µL de Solución de Lavado del kit y se centrifugó a 13200 rpm en una microcentrífuga Eppendorf® durante 1 minuto. Se descartó el flujo y se volvió a insertar la columna a otro tubo de colección. Este paso se repitió una vez más pero con 250 µL de solución de lavado. Se centrifugó a 13200 rpm en una microcentrífuga Eppendorf® por dos minutos y a temperatura ambiente. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo de 1,5 mL y se adicionó

100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Se centrifugó a 13200 rpm en una microcentrífuga Eppendorf® por un minuto a temperatura ambiente, se descartó la columna y el plásmido extraído se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su eventual uso.

Para confirmar la presencia del fragmento insertado en el vector, se procedió a la digestión del plásmido purificado con la enzima de restricción *EcoRI* con las condiciones de la tabla 6.

**Tabla 6.** Volumen de los reactivos utilizados en la digestión de los plásmidos purificados

Reactivo	1 reacción ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 10X	1,0
Enzima <i>EcoRI</i> (10U/ $\mu\text{L}$ )	0,5
DNA plasmídico	2,0
Agua libre de nucleasas	6,5

Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por dos horas y luego se agregó 1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga SALB 10X. Los productos de la digestión fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La visualización y registro de datos se procedió de la misma manera a como se ha descrito anteriormente. Se considero positiva la presencia del inserto al coincidir su tamaño con el esperado para cada marcador.

#### 5.2.2.6. Secuenciamiento de los fragmentos

Se envió 20  $\mu\text{L}$  del DNA plasmídico a los laboratorios de MACROGEN (Korea) para su secuenciamiento con el método de Sanger en sentido directo e inverso, utilizando los iniciadores SP6 y T7 del vector pGEM®-T Easy, respectivamente. Se secuenciaron 10 insertos provenientes de diferentes plásmidos purificados para cada marcador por cada individuo positivo.

#### 5.2.2.7.Comparación de secuencias

Se utilizó el software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation®) para procesar las secuencias directa e inversa de cada fragmento y obtener una secuencia consenso. El procedimiento consistió en cargar al software los archivos en formato AB1 de ambas direcciones de secuenciamiento para fragmento, los cuales muestran los electroferogramas resultantes de la secuenciación, y se corrigieron de manera manual las bases ambiguas, es decir, aquellas que el software era incapaz de reconocer como una base nitrogenada, debido a la presencia de un pico secundario de absorbancia en esa posición.

Las secuencias obtenidas para un determinado marcador en las entradas positivas de *S. tuberosum* ssp *andigena* fueron comparadas utilizando el software VectorNTI 9 (Invitrogen®). Se utilizó como patrón las secuencias de los alelos dominantes obtenidas del marcador M45 en la entrada I-1039 (Riccio *et al.*, datos no publicados) y la secuencia del marcador RySC3 obtenida en la entrada 2x(V-2)7 (Kasai *et al.*, 2000).

En el caso del marcador M6, se identificaron los sitios de corte para *RsaI* y así diferenciar los alelos dominantes de los alelos recesivos y de los neutros. Asimismo, se realizaron alineamientos entre los alelos dominantes presentes en las entradas positivas con la obtenidas por Riccio *et al.* (datos no publicados) en la variedad I-1039.

#### 5.2.2.8.Búsqueda de secuencias homólogas

Las secuencias de los alelos dominantes de los marcadores RySC3, M45 y M6 de las entradas positivas fueron empleadas para una búsqueda de secuencias homólogas en bancos de datos de secuencias nucleotídicas y aminoacidicas, para esta finalidad se utilizó el BlastN y tBlastN (National Center for Biotechnology Information).

#### 5.2.1.9. Tamizado para la resistencia a PVY

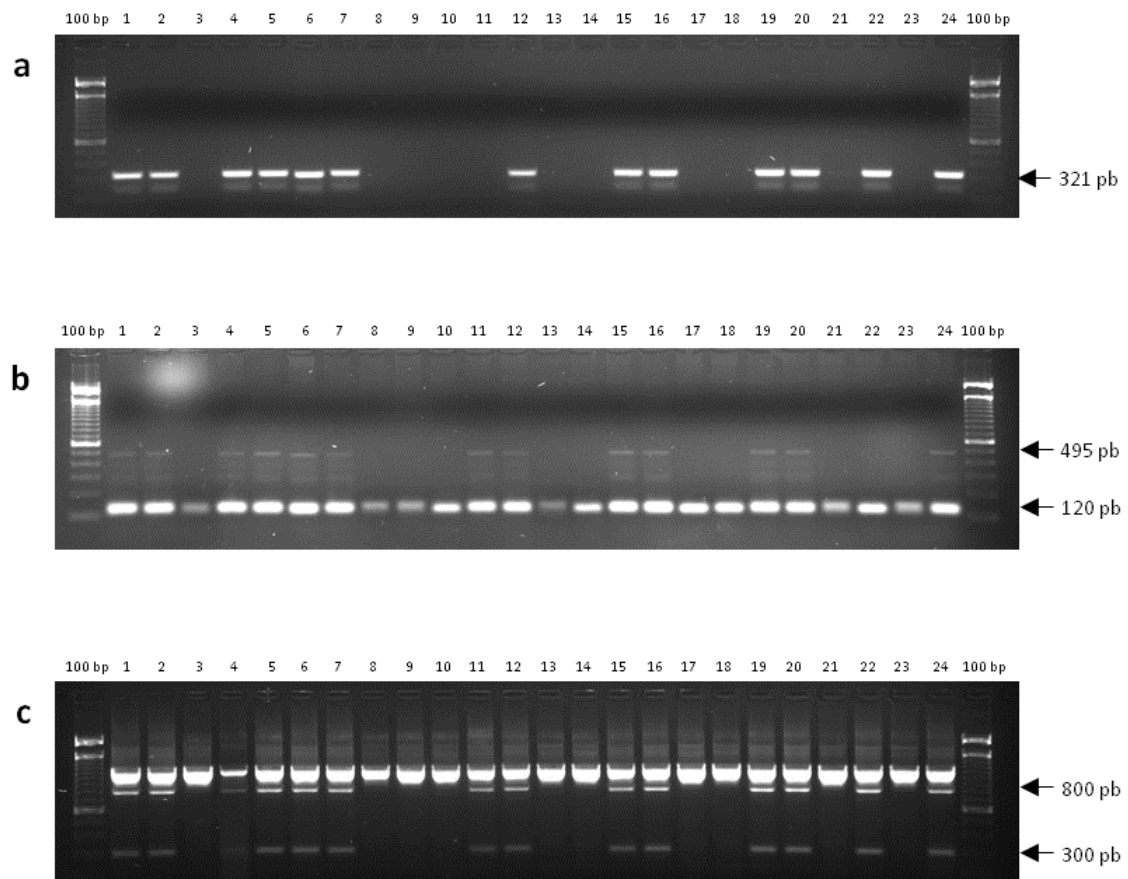
Se evaluó en el invernadero la resistencia al virus PVY de las entradas positivas a los marcadores ligados al gen  $Ry_{adg}$ . Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente en la primera parte de este trabajo.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Marcadores Ry en la población Costanera x LBr-43

De los 1089 individuos obtenidos del cruce entre Costanera x LBr-43, la calidad del DNA extraído con esta variación fue óptima según la metodología ya descrita. Utilizando el DNA extraído, se obtuvieron por PCR los alelos dominantes para los marcadores RySC3, M45 y M6 en los individuos de la progenie de la población Costanera x LBr-43 (figura 4) y se registraron los datos de presencia o ausencia de los mismos.



**Figura 4.** Productos de PCR obtenidos con los marcadores (a) RySC3, (b) M45 y (c) M6 en los individuos de la población Costanera x LBr-43 en gel de agarosa al 1%. Carril 100 bp: marcador de peso de 100 bp (Promega®); carril 1-24: individuos de la progenie Costanera x LBr-43. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha.

Los resultados obtenidos al amplificar los marcadores RySC3, M45 y M6 en la población Costanera x LBr-43 indican que en la variedad Costanera estos marcadores cosegregan y están presentes en la región del cromosoma XI donde se encuentra el gen *Ry<sub>adg</sub>*, debido a que el marcador RySC3 se encuentra ligado a este gen (Sorri *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2000).

Este es el primer reporte que indica que los marcadores M45 y M6 (ligados al gen *Ry<sub>sto</sub>*) cosegregan con el marcador RySC3 (ligado al gen *Ry<sub>adg</sub>*) en una variedad resistente a PVY que posee el gen *Ry<sub>adg</sub>*. Estos dos marcadores fueron reportados que están ligados al gen *Ry<sub>sto</sub>* del cromosoma XI en *S. stoloniferum*, en una posición cercana a *Ry<sub>adg</sub>* (Brigneti *et al.*, 1997). Posteriormente, otros estudios reportan que existe un segundo gen *Ry<sub>sto</sub>* localizado en el cromosoma XII de *S. stoloniferum* (Flis *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2000), sugiriendo la posibilidad de que los genes *Ry<sub>adg</sub>* y *Ry<sub>sto</sub>*, ambos presentes en el cromosoma XI, son variantes alélicas de un mismo gen (Rizza *et al.*, 2006). Esta hipótesis se ve respaldada por la insuficiente información del pedigrí de la variedad resistente I-1039 (portador del gen *Ry<sub>sto</sub>*) utilizado por Brigneti (Gebhardt y Valkonen, 2001) y en la falta de correlación de los polimorfismos de los marcadores desarrollados por Brigneti *et al.* (1997) con la resistencia en plantas que poseen el gen *Ry<sub>sto</sub>* (Heldak *et al.*, 2007).

Los resultados de cosegregación entre los marcadores RySC3, M45 y M6 obtenidos en el presente estudio reafirman la hipótesis de que los genes *Ry<sub>adg</sub>* y *Ry<sub>sto</sub>* (reportado por Brigneti *et al.*, 1997) son el mismo gen.

## **6.2. Recombinantes de los marcadores Ry**

Al realizar el análisis estadístico del  $\chi^2$  cuadrado, se observó que no existen diferencias significativas a un 95% de confianza ( $p > 0,05$ ) en la segregación de los alelos dominantes de los tres marcadores con respecto a la proporción 1:1 (tabla 7).

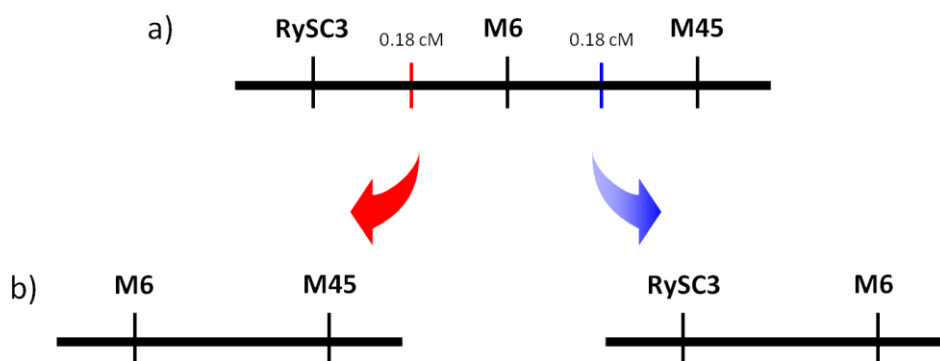
**Tabla 7.** Análisis de  $\chi^2$  de la segregación de los marcadores RySC3, M45 y M6 en la población Costanera x LBr-43

Marcador	Presencia	Ausencia	Proporcion esperada	X2 (1:1)
RySC3	510	579	544,5	4,37
M45	510	579	544,5	4,37
M6	512	577	544,5	3,88

Los ensayos de PCR que hemos utilizado no son sensitivos al dopaje alélico, por lo que la determinación del número de alelos resistentes presentes en una planta depende de cómo estos están distribuidos en una población segregante (Ottoman *et al.*, 2009). En nuestro caso, los resultados obtenidos en la población con los marcadores RySC3, M45 y M6 confirmaron la condición *simplex* y *nulplex* de Costanera y LBr-43, respectivamente.

El uso de plantas parentales resistentes a PVY con múltiples copias (*duplex*, *triplex* o *cuadriplex*) del gen de resistencia es deseado para maximizar la oportunidad de obtener plantas resistentes a PVY en una población completa (Ottoman *et al.*, 2009). Con los resultados obtenidos demostramos la aplicación práctica del MAS en el estudio de la resistencia a PVY, ya que nos permite obtener información sobre el dopaje alélico detectando el gen *Ry<sub>adg</sub>* en poblaciones segregantes utilizando marcadores moleculares sin tener que evaluar su resistencia o susceptibilidad en campo o invernadero (Whitworth *et al.*, 2009). Por otro lado, también se podrían utilizar estos marcadores para predecir la respuesta de las plantas a la enfermedad sin la presencia de la enfermedad (Ottoman *et al.*, 2009).

Del total de individuos evaluados, se encontró 4 recombinantes para los tres marcadores: 2 fueron positivos solo para los marcadores M6 y RySC3 (individuos 866 y 947), y otros 2 fueron positivos solo para los marcadores M45 y M6 (484 y 780). Teniendo en consideración estos resultados, el orden relativo de estos tres marcadores es M6 en el medio flanqueado por RySC3 y por M45 (figura 5). En este estudio se reporta por primera vez la posición de RySC3 con respecto a M45 y M6, ya que estos marcadores originalmente fueron reportados como específicos para *Ry<sub>adg</sub>* y *Ry<sub>sto</sub>* (Brigneti *et al.*, 1997; Kasai *et al.*, 2000).



**Figura 5.** a) Posición relativa de los marcadores RySC3, M6 y M45 en la variedad Costanera. Se indica la distancia genética que los separa. Las líneas roja y azul indican los puntos de recombinación entre estos marcadores. b) Genotipos de los individuos recombinantes obtenidos en el presente estudio en base a los puntos de recombinación reportados.

Al calcular la distancia genética o frecuencia de recombinación de los marcadores evaluados en base a los recombinantes obtenidos, se obtuvo que la distancia genética entre RySC3 y M6 fue de 0,18 cM, mientras que entre M6 y M45 fue de 0,18 cM. Estas distancias obtenidas son consecuencia de que 1085 individuos de la población Costanera x LBr-43 fueron positivos para los 3 marcadores, indicando que estos están estrechamente ligados entre sí.

Por otro lado, según Brigneti *et al.* (1997), la distancia entre los marcadores M45 y M6 fue de 3 cM. Esta distancia es mucho mayor a la reportada en el presente estudio y lo cual se debe principalmente al tamaño de la población segregante evaluada, ya que Brigneti *et al.* (1997) utilizó una población de 310 individuos mientras que en el presente estudio se utilizó una población de 1089 individuos. Si consideramos la fórmula para obtener la frecuencia de recombinación de dos marcadores ligados, se obtendrán valores mas pequeños a medida que se utilice una población más grande, permitiendo una mejor resolución en la distancia.

Este tipo de procedimiento, que consiste en aumentar el tamaño de una población segregante para obtener una mejor resolución en la distancia genética, se ha aplicado para la identificación del gen *Gpa2* en papa (el cual confiere

resistencia al nemátodo *Globodera pallida*) (van der Voort *et al.*, 1999), para reducir el intervalo de mapeo del locus *Dgt* de tomate (Oh *et al.*, 2002) y para encontrar un marcador más estrechamente ligado al gen *R1* de algodón (Liang *et al.*, 2009).

Si consideramos que la distancia genética de 1 cM corresponde en promedio a la distancia física de 1 Mb en el genoma de la papa (Ballvora *et al.*, 1995), la distancia comprendida entre los marcadores RySC3 y M45 es de 360 kb. Si consideramos que el gen *Ry<sub>adg</sub>* está en esta región, el aislamiento del gen utilizando el clonamiento basado en el mapa genético no podría presentar dificultades, como las que reporta Zhang *et al.* (2003).

En la evaluación fenotípica de los individuos recombinantes para los marcadores evaluados, los individuos 866 y 947, que fueron positivos solo para los marcadores RySC3 y M6, mostraron una sintomatología tipo mosaico severo en las hojas y en algunos casos necrosis, los cuales son síntomas característicos de una infección por PVY. Las pruebas de DAS-ELISA y NASH confirmaron que estos dos recombinantes fueron susceptibles.

Por otro lado, los individuos recombinantes 484 y 780, que fueron positivos solo para los marcadores M6 y M45, no mostraron ningún tipo de síntoma de infección viral, tanto para las que fueron inoculadas mecánicamente y mediante injerto. Posteriormente, con las técnicas del DAS-ELISA y NASH no se detectó infecciones con PVY comprobándose la inmunidad de estos dos individuos.

Estos resultados indican que el gen de resistencia *Ry<sub>adg</sub>* se localiza en el cromosoma XI, en la región comprendida entre los marcadores M6 y M45, la cual tiene una longitud de 180 kb, o muy cercana a esta. La resolución obtenida podría permitir el aislamiento del gen por medio de una librería genómica de BAC (Lapitan *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2000). Asimismo, con la utilización de la información del Proyecto del Secuenciamiento del Genoma de la Papa, en la que se están secuenciando dos genotipos diferentes de papa (Visser *et al.*, 2009), podrían diseñarse nuevos marcadores más cercanos al gen *Ry<sub>adg</sub>*.

### 6.3.Detección del gen *Ry<sub>adg</sub>* en el germoplasma de *S. tuberosum* ssp *andigena*

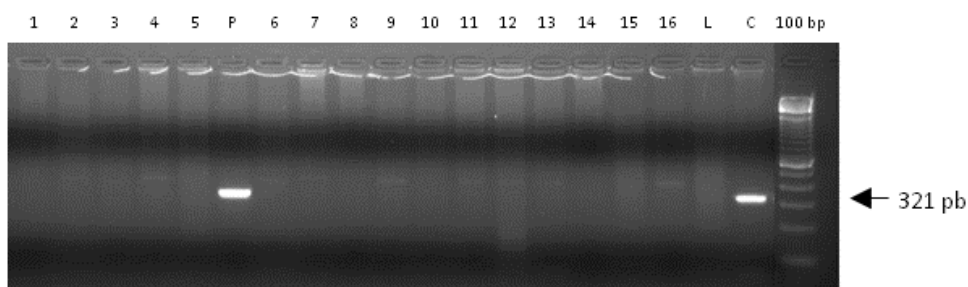
Se realizó la amplificación por PCR de 251 entradas de *S. tuberosum* ssp *andigena* con los marcadores RySC3 (figura 6) y M45 (figura 7). De la población evaluada, solo la entrada nativa CIP 705777 (Pisha Milpo) fue positiva para ambos marcadores, mientras que todas las restantes fueron negativas. De estos resultados, se puede indicar que existe una baja frecuencia del gen *Ry<sub>adg</sub>* en el germoplasma de *S. tuberosum* ssp *andigena* (0,4 %).

Se obtuvieron los mismos resultados al amplificar los marcadores RySC3 y M45 utilizando como molde el DNA de la entrada Pisha Milpo obtenido a partir de plántulas crecidas *in vitro*. Al digerir el amplificado obtenido con el marcador M6 se observó que esta entrada también es positiva para este marcador (figura 8). Posteriormente, se obtuvieron las secuencias consenso de 10 clones secuenciados para cada los marcadores RySC3, M45 y M6 en la entrada Pisha Milpo.

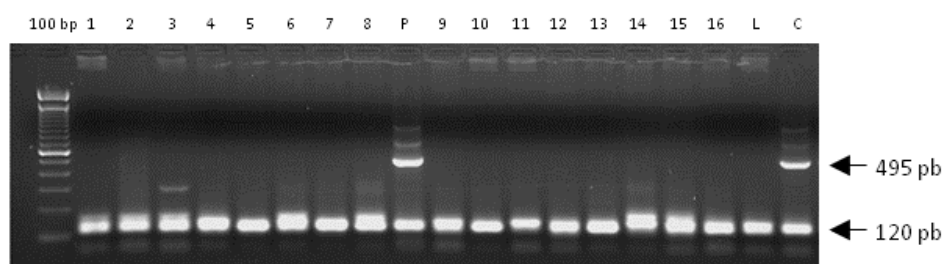
En el caso de los marcadores RySC3 y M45, todos los clones pertenecen al alelo dominante y se obtuvo una secuencia consenso que se indica en la tabla 8.

**Tabla 8.** Secuencia nucleotídica consenso de los fragmentos obtenidos con los marcadores RySC3 y M45 en la entrada Pisha Milpo

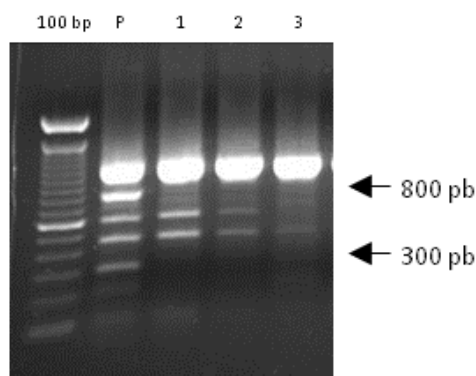
Marcador	Secuencia
RySC3 321 pb	atacactcatctaaattgatgggtgcttcttcctccggacaataaagaaaacaagtatgaaatacattctctgcaaagta tccttctctctaaactggtaggggaaaaagaaaattgtgtgcatgataaggaggacgggagggcacctgatggctcgta gacttcggttgaagaaagtctagttgtgcttgataacatagatcatgaagaccaattgaaatacctagcaggggatcttg gttggttggcaatggcaccagaattattgcaacaacgagagacaagcatttcattcggaaaaatgatgccgtatatcct
M45 495 pb	actagtttctgagcatgtaattccatacaaaagtaaaatcaacaattnttatttcncacgttgagttataataataaanc atntngtttancnttttcatcattcnttatgtgtttgaatagctgcagcaatttctgtctctacgaaggatagatctaagtac tctaaaagcctgaagaggacaccagatttcaaggggatgccaaatttggagtatttggatctaagggactgtaggagt ctgaagaagttcatccttccctcaagtattgcaaaaaactcattgagttaaattgtttattgtacaagccttgagttctctt tagataatttaccctttattataataataaaaaatgattttatctagtttctgagcatgtaatttcatagaacaatttctcatttca cacgttaagtataataataacatgtcgtttactactttcatcgcctctatgtgtttgaatagctgca



**Figura 6.** Productos de PCR obtenidos con el marcador RySC3 en las entradas de la población de *S. tuberosum* ssp *andigena* en gel de agarosa al 1% en solución tampón TBE 1X. Carril 100 bp: marcador de peso de 100 bp (Promega®); carril L: variedad LBr-43; carril C: variedad Costanera; carril P: entrada Pisha Milpo; carril 1-16: entradas de *S. tuberosum* ssp *andigena*. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha.



**Figura 7.** Productos de PCR obtenidos con el marcador M45 en las entradas de la población de *S. tuberosum* ssp *andigena* en gel de agarosa al 1% en solución tampón TBE 1X. Carril 100 bp: marcador de peso de 100 bp (Promega®); carril L: variedad LBr-43; carril C: variedad Costanera; carril P: entrada Pisha Milpo; carril 1-16: entradas de *S. tuberosum* ssp *andigena*. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha



**Figura 8.** Productos de PCR del marcador M6 digeridos en las entradas de la población de *S. tuberosum* ssp *andigena* en gel de agarosa al 1% en solución tampón TBE 1X. Carril 100 bp: marcador de peso de 100 bp (Promega®); carril P: entrada Pisha Milpo; carril 1-3: entradas de *S. tuberosum* ssp *andigena*. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha.

Al comparar la secuencia del fragmento obtenido con el marcador RySC3 de Pisha Milpo con la reportada en la entrada 2x(V-2)7 (Sorri *et al.*, 1999), se encontró que tienen un porcentaje de similaridad del 99,7% debido a que sólo se diferencian en el cambio de un nucleótido (figura 9).

		151		200
RySC3_2x(V-2)7	(151)	ATGGCTCGTAGACTTCGTTTGAAGAAAGTTCTAGTTGTGCTTGATAACAT		
RySC3_Pisha_Milpo	(151)	ATGGCTCGTAGACTTCGTTTGAAGAAAGTTCTAGTTGTGCTTGATAACAT		
Consensus	(151)	ATGGCTCGTAGACTTCGTTTGAAGAAAGTTCTAGTTGTGCTTGATAACAT		
		201		250
RySC3_2x(V-2)7	(201)	AGATCATGAAGACCAATTCAAATACCTAGCAGGGGATCTTGGTTGGTTTG		
RySC3_Pisha_Milpo	(201)	AGATCATGAAGACCAATTGAAATACCTAGCAGGGGATCTTGGTTGGTTTG		
Consensus	(201)	AGATCATGAAGACCAATT AAATACCTAGCAGGGGATCTTGGTTGGTTTG		
		251		300
RySC3_2x(V-2)7	(251)	GCAATGGCACCAGAATTATTGCAACAACGAGAGACAAGCATTTTCATTTCGG		
RySC3_Pisha_Milpo	(251)	GCAATGGCACCAGAATTATTGCAACAACGAGAGACAAGCATTTTCATTTCGG		
Consensus	(251)	GCAATGGCACCAGAATTATTGCAACAACGAGAGACAAGCATTTTCATTTCGG		

**Figura 9.** Alineamiento entre las secuencias obtenidos con el marcador RySC3 en la variedad 2x(V-2)7 y la entrada Pisha Milpo. La flecha roja indica la diferencia a nivel de nucleótido entre las dos secuencias. Se muestra solo la región de interés.



En el caso del marcador M45, las secuencias de Pisha Milpo e I-1039 también tienen un alto grado de similaridad (97,4%) y se diferencian en el cambio de 13 nucleótidos (figura 10).

M45_I_1039	(1)	1	CCTAGTTTCTGAGCATGTAATTTCCATACAAAGTAAAATCAAACAATTTTC	5
M45_Pisha_Milpo	(1)		CCTAGTTTCTGAGCATGTAATTTCCATACAAAGTAAAATCAANCAATTTN	
Consensus	(1)		CCTAGTTTCTGAGCATGTAATTTCCATACAAAGTAAAATCAA CAATTT	
M45_I_1039	(51)	51	TTATTTTCACACGTTGAGTTATAATAATATAAACATGTGGTTTACTCATTT	100
M45_Pisha_Milpo	(51)		TTATTTTCNCACGTTGAGTTATAATAATATAANCAATNTNGTTTANTCNTTT	
Consensus	(51)		TTATTTTC CACGTTGAGTTATAATAATATAA CAT T GTTTA TC TTT	
M45_I_1039	(101)	101	TCATCATTCTTTATGTGTTTTGAATAGCTGCAGCAATTTCTGTCTCTACG	150
M45_Pisha_Milpo	(101)		TCATCATTCTTTATGTGTTTTGAATAGCTGCAGCAATTTCTGTCTCTACG	
Consensus	(101)		TCATCATTC TTATGTGTTTTGAATAGCTGCAGCAATTTCTGTCTCTACG	
M45_I_1039	(151)	151	AAGGATAGATCTAAGTGACTCTAAAAGCCTGAAGAGGACACCAGATTTCA	200
M45_Pisha_Milpo	(151)		AAGGATAGATCTAAGTGACTCTAAAAGCCTGAAGAGGACACCAGATTTCA	
Consensus	(151)		AAGGATAGATCTAAGTGACTCTAAAAGCCTGAAGAGGACACCAGATTTCA	
M45_I_1039	(201)	201	AGGGGATGCCAAATTTGGAGTATTTGGATCTAAGGGACTGTAGGAGTCTT	250
M45_Pisha_Milpo	(201)		AGGGGATGCCAAATTTGGAGTATTTGGATCTAAGGGACTGTAGGAGTCTT	
Consensus	(201)		AGGGGATGCCAAATTTGGAGTATTTGGATCTAAGGGACTGTAGGAGTCTT	
M45_I_1039	(251)	251	GAAGAAGTTCATCCTTCCCTCAAGTATTGCAAAAACTCATTGAGTTAAA	300
M45_Pisha_Milpo	(251)		GAAGAAGTTCATCCTTCCCTCAAGTATTGCAAAAACTCATTGAGTTAAA	
Consensus	(251)		GAAGAAGTTCATCCTTCCCTCAAGTATTGCAAAAACTCATTGAGTTAAA	
M45_I_1039	(301)	301	TTTGTTTTATTGTACAAGCCTTGAGTTCTTCTTTTAGATATTTTACCTTT	350
M45_Pisha_Milpo	(301)		TTTGTTTTATTGTACAAGCCTTGAGTTCTTCTTTTAGATATTTTACCTTT	
Consensus	(301)		TTTGTTTTATTGTACAAGCCTTGAGTTCTTCTTTTAGATATTTTACCTTT	
M45_I_1039	(351)	351	TATTTATAATAATCAAAATGATTTTTATCTAGTTTCTGAGCATGTAATTT	400
M45_Pisha_Milpo	(351)		TATTTATAATAATAAAATGATTTTTATCTAGTTTCTGAGCATGTAATTT	
Consensus	(351)		TATTTATAATAAT AAAATGATTTTTATCTAGTTTCTGAGCATGTAATTT	
M45_I_1039	(401)	401	TCCTAGAAACAATTTCTCATTTCACCCGTTAAGTTATAATATAAACATGT	450
M45_Pisha_Milpo	(401)		TCATAGAAACAATTTCTCATTTCACACGTTAAGTTATAATATAAACATGT	
Consensus	(401)		TC TAGAAACAATTTCTCATTTCAC CGTTAAGTTATAATATAAACATGT	
M45_I_1039	(451)	451	CGTTCACTACTTTTCATCGCTCCTTATGTGTTTTGAATAGCTGCA	495
M45_Pisha_Milpo	(451)		CGTTTACTACTTTTCATCGCTCCTTATGTGTTTTGAATAGCTGCA	
Consensus	(451)		CGTT ACTACTTTTCATCGCTCCTTATGTGTTTTGAATAGCTGCA	

**Figura 10.** Alineamiento entre las secuencias obtenidas con el marcador M45 en la variedad I-1039 y la entrada Pisha Milpo. Las flechas rojas indican las diferencias a nivel de nucleótido entre las dos secuencias.

En el caso del marcador M6, se obtuvo la secuencia consenso de 10 clones diferentes que podrían ser alelos dominantes, recesivos o neutros debido a que la purificación de los fragmentos se realizó antes de la digestión con la enzima de restricción *RsaI*. Utilizando el software VectorNTI 9 se identificó 3 secuencias correspondientes al alelo dominante debido a la presencia de un sitio de restricción para la enzima *RsaI* en la posición aproximada de 800 pb, lo cual nos permite obtener fragmentos de 300 y 800 pb, característicos de un alelo dominante.

Utilizando estas tres secuencias se obtuvo una secuencia consenso para el alelo dominante presente en Pisha Milpo (tabla 9), la cual tiene una longitud total de 1096 bp y un único sitio de corte para *RsaI* en la posición 802.

**Tabla 9.** Secuencia nucleotídica consenso del alelo dominante del marcador M6 de Pisha Milpo

Marcador	Secuencia
M6 1096 pb	tccgaaatgttgggctgacatcaaatttgaaaacatgatataagttgatatggagaatatgtagacaaaca aggtaaatacactgtttacaatgttctgcaattaacataactgatcaaatttctaagaagaatggataagatt attgttctagcccaaaaagaagatctattgacatgaaaagacaatttacagctgcaggacaaccccaaa ccatttaataaacaatcaaatcacacggtgtagcagaaccagtcctgaacgacacaaatgtatagat gtgggaaaaaactaactacaaagttttgaaactaaaggcaaactgtgtttaccaacccctccctggag acgatgtttatgcaggcagctgtatgctgtttttcataaaaatatttctgaatctgacaacaatcatatagggtg ggctctcattatatcattacacttctatcagaaactcatgtttctgcactgttaaagtgaagtattcaaagttca ataaatgtgtctagactgattttctttggtttataaacggcaggtctccagactaacttatcacaaggggtgtat gtaaacatgcaaatcaaggttctagatacgccactccacataaggcaattcctaaaacaaagaaacat gagctgctcggggtcaccacttaacaaagatttttagttagataaagacagaatacaaaaatccactatcac atttatcacggatgggtccaattagacgtgctaactagttagggtattcaaattcacaattgtattaaacccgg atgtacatatacaggaagcttaaccacacatgcaaggttcagatatccatgccccctcccagtcacact tttctttctctatatgtgtgatgattcttcaaaaatatagcacattcaactgactctttcttctatcaccgcaa aagacaacagcaattgaatcattgaagttacactacacatgccacaaactttcaaaattacatgcagaaa agacaaagcacacagaaagtgaatggtattacctgagattttgatgatacttctgaaccaccttttgg atccctt

Al comparar la secuencia del fragmento obtenido con el marcador M6 de Pisha Milpo con la reportada en la entrada I-1039 (Cinzia *et al.*, resultados no publicados), se encontró que tienen un alto porcentaje de similitud (99,8%) debido a que solo se diferencian en el cambio de un nucleótido y en la inserción de otro (figura 11).

M6_I_1039_Resistente	(401)	401	TTTCTTGAATCTGACAACAATCATATAGGTGGGTCTCTCATTATATCATT	450
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(401)	TTTCTTGAATCTGACAACAATCATATAGGTGGGTCTCTCATTATATCATT		
Consensus	(401)	TTTCTTGAATCTGACAACAATCATATAGGTGGGTCTCTCATTATATCATT		
M6_I_1039_Resistente	(451)	451	ACACTTCTATCAGAAACTCATGTTTCTGCACTTGTAAGTGAAGTTATTC	500
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(451)	ACACTTCTATCAGAAACTCATGTTTCTGCACTTGTAAGTGAAGTTATTC		
Consensus	(451)	ACACTTCTATCAGAAACTCATGTTTCTGCACTTGTAAGTGAAGTTATTC		
M6_I_1039_Resistente	(501)	501	AAAGTTCAATAAATGTGTCTAGACTGATTTTCTTTTG-TTTATAAACGGC	550
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(501)	AAAGTTCAATAAATGTGTCTAGACTGATTTTCTTTTGTTTATAAACGGC		
Consensus	(501)	AAAGTTCAATAAATGTGTCTAGACTGATTTTCTTTTG TTTATAAACGGC		
M6_I_1039_Resistente	(550)	551	AGGTCTCCAGACTAACTTATCACAAAGGGTTGTATGTAAACATGCAAATCA	600
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(551)	AGGTCTCCAGACTAACTTATCACAAAGGGTTGTATGTAAACATGCAAATCA		
Consensus	(551)	AGGTCTCCAGACTAACTTATCACAAAGGGTTGTATGTAAACATGCAAATCA		
M6_I_1039_Resistente	(600)	601	AGGTTTCTAGATACGCCACTCCACATAAGGCAATTCTCTAAACAAAGAAA	650
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(601)	AGGTTTCTAGATACGCCACTCCACATAAGGCAATTCTCTAAACAAAGAAA		
Consensus	(601)	AGGTTTCTAGATACGCCACTCCACATAAGGCAATTCTCTAAACAAAGAAA		
M6_I_1039_Resistente	(650)	651	CATGAGCTGCTCGGGGTCACCACTTAACAAAGATTTTAGTTAGATAAAGA	700
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(651)	CATGAGCTGCTCGGGGTCACCACTTAACAAAGATTTTAGTTAGATAAAGA		
Consensus	(651)	CATGAGCTGCTCGGGGTCACCACTTAACAAAGATTTTAGTTAGATAAAGA		
M6_I_1039_Resistente	(700)	701	CAGAATACAAAATCCACTATCACATTTATCACGGATGGGCTCCAATTAGA	750
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(701)	CAGAATACAAAATCCACTATCACATTTATCACGGATGGGTTCCAATTAGA		
Consensus	(701)	CAGAATACAAAATCCACTATCACATTTATCACGGATGGG TCCAATTAGA		
M6_I_1039_Resistente	(750)	751	CGTGCTAACTAGTTAGGGATTCAAATTCACAATTGTATTAAACCCGGATG	800
M6_Pisha_Milpo_Resistente	(751)	CGTGCTAACTAGTTAGGGATTCAAATTCACAATTGTATTAAACCCGGATG		
Consensus	(751)	CGTGCTAACTAGTTAGGGATTCAAATTCACAATTGTATTAAACCCGGATG		

**Figura 11.** Alineamiento entre las secuencias de los alelos dominantes o resistentes obtenidos con el marcador M6 en la variedad I-1039 y la entrada Pisha Milpo. Las flechas rojas indican las diferencias a nivel de nucleótido entre las dos secuencias. Se muestra solo la región de interés.

Al realizar un BlastN de las secuencias consenso de RySC3 y M45 contra las secuencias nucleotídicas depositadas en el GenBank, no se encontró una similitud significativa con las secuencias depositadas en este banco de datos. Por el contrario, al realizar un tBlastN contra secuencias del banco de datos de proteínas Swiss-Prot, se encontró que solo los fragmentos de RySC3 y M45 de Pisha Milpo son homólogos a la proteína N de *Nicotiana glutinosa* con un porcentaje de identidad del 65 % en ambos casos.

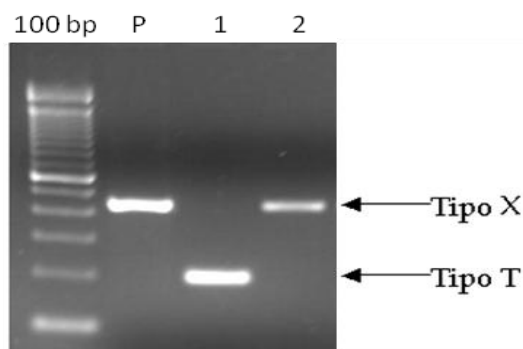
La proteína N confiere a la planta resistencia contra patógenos mediante la activación de un sistema de defensa (que incluye una respuesta hipersensitiva) que restringe el crecimiento del patógeno (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000). Asimismo, presenta un motivo quinasa 3a, la cual también es codificado por el fragmento obtenido con el marcador RySC3 (Sorri *et al.*, 1999).

Por otro lado, el marcador M6 no tuvo ninguna similaridad con secuencias nucleotídica del Genbank y aminoácidas del Swiss-Prot, por lo que este fragmento pertenecer a región no codificante.

A pesar de que los fragmentos obtenidos con los marcadores RySC3 y M45 tienen similitud con un gen de resistencia, estos no corresponderían al gen *Ry<sub>adg</sub>*, debido a que la región del cromosoma XI en donde se localiza este gen se caracteriza por contener otros genes de resistencia a otros patógenos de papa, pseudogenes y secuencias repetitivas (Gebhardt y Valkonen, 2001), lo cual dificulta en gran medida el aislamiento de este gen de resistencia.

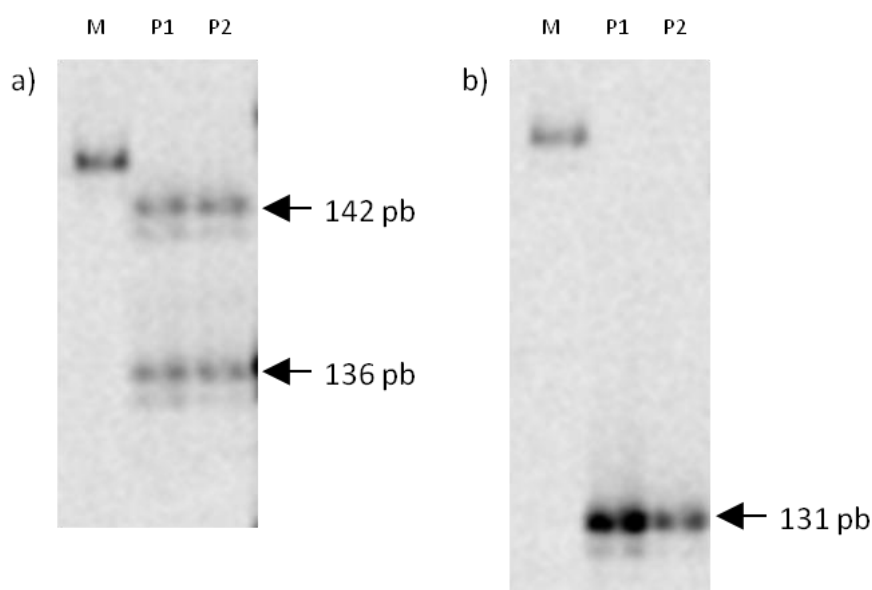
#### 6.4. Comprobación de la identidad y resistencia a PVY de Pisha Milpo

Utilizando el marcador de cloroplasto desarrollado por Hosaka *et al.* (2002), se observó que la entrada Pisha Milpo no presenta la delección en esta región genómica del cloroplasto flanqueada por los iniciadores (polimorfismo del tipo X) (figura 12), por lo que se confirma su identidad como *S. tuberosum ssp andigena*.



**Figura 12.** Productos de PCR obtenidos con el marcador de cloroplasto en entradas de *S. tuberosum* en gel de agarosa al 1%. Carril 100 bp: marcador de peso de 100 bp (Promega®); carril P: entrada Pisha Milpo; carril 1: control de *S. tuberosum ssp tuberosum*; carril 2: control de *S. tuberosum ssp andigena*. El tipo de cloroplasto se indica a la derecha: Tipo X (450 bp) y Tipo T (200 bp).

De la misma manera, al comparar el patrón alélico de los 24 microsatélites del PGI kit de obtenidos con DNA de Pisha Milpo procedente de la Colección de DNA y obtenida de una nueva extracción a partir de una plántula *in vitro* mantenida en el Banco de Germoplasma del CIP, se observó que tienen el mismo patrón en todos los casos (figura 13). Los alelos reportados en este estudio coinciden con los reportados por Spooner *et al.* (2007), confirmándose la identidad de la única entrada positiva a los marcadores Ry como Pisha Milpo.



**Figura 13.** Productos de PCR obtenidos con los marcadores microsatélites a) STI0032 y b) STI0033 en la entrada Pisha Milpo en gel de poliacrilamida al 6.5%. Carril M: marcador de peso molecular; carril P1: entrada Pisha Milpo proveniente de la Colección del ABL; carril P2: entrada Pisha Milpo proveniente del Banco de Germoplasma del CIP. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha.

Con respecto a la evaluación de la resistencia a PVY, la entrada Pisha Milpo y la variedad Costanera (control resistente a PVY) no mostraron ningún tipo de síntoma visual, tanto para las que fueron inoculadas mecánicamente y por injerto (figura 14). Posteriormente, con las técnicas del DAS-ELISA y NASH no se detectó infecciones con PVY comprobándose la inmunidad de estas dos entradas.



**Figura 14.** Plántula de la entrada Pisha Milpo 25 días después de ser inoculada con PVY<sup>o</sup>.

En el caso de la variedad LBr-43 (control susceptible a PVY), esta presentó un mosaico severo en las hojas (figura 15), lo cual indica que son susceptibles a PVY<sup>o</sup>. Esto fue confirmado con el DAS-ELISA y NASH, ya que se detectaron infecciones en estas plantas.



**Figura 15.** Plántula de la variedad LBr-43 25 días después de ser inoculada con PVY<sup>o</sup>.

Estos resultados, conjuntamente con los reportados a nivel molecular en el presente trabajo, confirman que la entrada nativa Pisha Milpo posee el gen de resistencia  $R_{y_{adg}}$  y es inmune al virus PVY, por lo que podría ser utilizada en futuros programas de mejoramiento de papa.



## 7. CONCLUSIONES

---

1. Se comprobó la condición simplex de la variedad Costanera al obtener una proporción 1:1 en la segregación de los marcadores ligados al gen *Ry<sub>adg</sub>*.
2. El orden de los marcadores ligados al gen *Ry<sub>adg</sub>* fue M6 en el centro y flanqueado por los marcadores RySC3 y M45, separado en ambos casos por 0,18 cM.
3. El gen *Ry<sub>adg</sub>* se encuentra aproximadamente en la región de 180 kb comprendida entre los marcadores M6 y M45, o muy cercana a esta región.
4. El gen *Ry<sub>adg</sub>* se encuentra en una baja frecuencia en el germoplasma de *S. tuberosum ssp andigena*.
5. Se identificó a la entrada nativa de Pisha Milpo como una nueva fuente de resistencia al virus PVY.

## 8. RECOMENDACIONES

---

1. Se recomienda utilizar la información disponible del proyecto del secuenciamiento del genoma de la papa para desarrollar nuevos marcadores que estén más estrechamente ligados al gen *Ry<sub>adg</sub>*.
2. Evaluar más individuos segregantes provenientes del cruzamiento Costanera x LBr-43 para obtener más recombinantes que confirmen la posición del gen *Ry<sub>adg</sub>* reportado en el presente trabajo.
3. Construir una librería genómica de la variedad Costanera e identificar BACs que sean positivos para los marcadores M6 y M45 con la finalidad de aislar el gen *Ry<sub>adg</sub>*.
4. Utilizar los marcadores M6 y M45 en el desarrollo de un método de cuantificación de dosaje alélico utilizando PCR en tiempo real.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

---

- BAGNAL, R.H. 1952. Hypersensitivity, a form of resistance to plant viruses in potatoes. 34<sup>th</sup> Report Quebec Society for Protection of Plants 34:128-131.
- BALLVORA, A.; HESSELBACH, J.; NIEWOHRNER, J.; LEISTER, D.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. 1995. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. Molecular Genomics and Genetics 249:82-90.
- BARKER, H.; HARRISON, B.D. 1984. Expression of genes for resistance to potato virus Y in potato plants and protoplasts. Annals of Applied Biology 105: 539-545.
- BRIGNETI, G.; GARCIA-MAS, J.; BAULCOMBE, D.C. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry<sub>sto</sub>* in potato. Theoretical and Applied Genetics 94:198-203.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1997 Techniques in Plant Virology at CIP. Salazar, L.; Jayasinghe, U. (Eds).
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 2004. Extracción de DNA de plantas. En Herrera, M.R.; Ghislain, M. (Eds). Protocolos de Laboratorio de Biotecnología Aplicada: Tipificación Genética. Manual de Capacitación. 3ra edición.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 2006. Conducting evaluation for extreme resistance (ER) to PVX and PVY En: Bonierbale, M.; de Haan, S.; Forbes, A. (Eds). Procedures for Standard evaluation trails of advances potato clones.
- COCKERHAM, G. 1970. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. Heredity 25:309-348.

- CRIBB, P.J.; HAWKES, J.G. 1986. Experimental evidence for the origin of *Solanum tuberosum* subspecies *andigena*. En: D'Arcy, W.G. (Ed.). Solanaceae: Biology and Systematics. International Symposium on the Biology and Systematics of the Solanaceae. Del 3 al 6 de agosto de 1983. Columbia University Press.
- CUBERO, J. I. 2003. Marcadores y mapas genéticos. En: Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- DE BOKX, J.A.; HUTTINGA, H. 1981. Potato virus Y. En: Descriptions of Plant Viruses. Número 242. CMI/AAB.
- DINESH-KUMAR, S.P.; THAM, W.H.; BAKER, B.J. 2000. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. PNAS 97(26):14789-14794.
- FERNANDEZ-NORTHCOTE, E.N. 1980. Progress in PVX-PVY research strategy for virus management in potatoes. Report of Planning Conference at CIP. Lima.
- FLIS, B.; HENNIG, J.; STRZELCZYK-ZYTA, D.; GEBHARDT, C.; MARCZEWSKI, W. 2005. The *Ry-f<sub>sto</sub>* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122<sub>718</sub> in PVY resistant potato cultivars. Molecular Breeding 15:95-101.
- GADUM, J.; PEREIRA, C.A.B.; DUARTE, M.C. 2003. Agronomic performance and reaction of potato clones to PVY. Ciência e Agrotecnologia:1484-1492.
- GARDNER, E.J. 1971. Principios de Genética. 2da edición. Editorial Limusa – Wiley.
- GEBHARDT, C.; VALKONEN, J.P. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. Annual Review Phytopathology 39:79-102.

- GEBHARDT, C.; BELLIN, D.; HENSELEWSKI, H.; LEHMANN, W.; SCHWARZFISCHER, J.; VALKONEN, J.P.T. 2006. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1458-1464.
- GHISLAIN, M.; NUÑEZ, J.; HERRERA, R.; PIGNATARO, J.; GUZMAN, F.; BONIERBALE, M.; SPOONER, D. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding* 23:377-388.
- HAMALAINEN, J.H.; WATANABE, K.N.; VALKONEN, J.P.T.; ARIHARA, A.; PLAISTED, R.L.; PEHU, E.; MILLER, L.; SLACK, S.A. 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical and Applied Genetics* 94:192-197.
- HAMALAINEN, J.H.; SORRI, V.A.; WATANABE, K.N.; GEBHARDT, C.; VALKONEN, J.P.T. 1998. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theoretical and Applied Genetics* 96:1036-1043.
- HAWKES, J.G. 1956. A revision of the tuber-bearing Solanums. En: Scottish Plant Breeding Station. Annual Report 1956.
- HAWKES, J.G. 1990. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Smithsonian Institution Press.
- HAWKES, J.G. 1992. Biosystematics of the potato. En: Harris, P. (Ed.). The potato crop: The scientific basis for improvement. Segunda Edición. Chapman & Hall.
- HAWKES, J.G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. En: Bradshaw, J.E.; Mackay, G.R. (Ed.). Potato Genetics. CAB International.
- HELDAK, J.; BEZO, M.; STEFUNOVA, V.; GALLIKOVA, A. 2007. Selection of DNA Markers for Detection of Extreme Resistance to Potato Virus Y in

Tetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.) F<sub>1</sub> Progenies. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 43(4):125-134.

- HOSAKA, K. 2002. Distribution of the 241 bp Deletion of Chloroplast DNA in Wild Potato Species. American Journal of Potato Research 79:119-123.
- HOWARD, H.W. 1973. Dihaploid studies in relation to the origin of *Solanum tuberosum*. Potato Research 16(4):325.
- JOHANSEN, R.H. 1957. Field resistance of the potato selection ND457-1 to virus Y 1,2. American Potato Journal 34:169-176.
- JONES, R.; KUMAR, S.; MACKIE, A. 2003. Potato Virus Y. En: Department of Agriculture Factsheet. Australia.
- KASAI, K.; MORIKAWA, Y.; SORRI, V.A.; VALKONEN, J.P.T.; GEBHARDT, C.; WATANABE, K.N. 2000. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry<sub>adg</sub>* on a common feature of plant disease resistance genes. Genome 43:1-8.
- LAPITAN, N.L.V.; BROWN, S.E.; KENNARD, W.; STEPHENS, J.L.; KNUDSON, D.L. 1997. FISH physical mapping with barley BAC clones. Plant Journal 11:149-156.
- LE ROMANCER, M.; NEDELLEC, M. 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). Plant Pathology 46:104-111.
- LIANG, Z.; CAIPING, C.; TIANZHEN, Z.; WANGZHEN, G. 2009. Fine mapping of the red plant gene R1 in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). Chinese Science Bulletin 54(9):1529-1533.
- MESTRE, P.; BRIGNETI, G.; BAULCOMBE, D.C. 2000. An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the NIa proteinase from potato virus Y. Plant Journal 23(5):653-661.

- MIHOVILOVICH, E. 1996. Desarrollo e Identificación de Clones Parentales Inmunes a los Virus X e Y de la Papa: Un Éxito del Mejoramiento. CIP Circular.
- MIHOVILOVICH, E.; SALAZAR, L.F.; SAGUMA, F.; BONIARBALE, M.W. 1997. Survey of the Durability of Extreme Resistance to PVY Derived from *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. En: CIP Program Report 1997-98. Perú.
- MINAG. 2010. Ministerio de Agricultura. Portal Agrario. <http://www.minag.gob.pe>
- MULDER, A.; TURKENSTEEN, L.J. 2004. Potato diseases: Diseases, pest and defects. NIVAP. The Netherlands.
- MUÑOZ, F.L.; PLAISTED, R.L.; THURSTON, H.D. 1975. Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. American Potato Journal 52:107-115.
- OH, K.; HARDEMAN, K.; IVANCHENKO, M. G.; ELLARD-IVEY, M.; NEBENFÜHR, A.; WHITE, T.; LOMAX, T. L. 2002. Fine mapping in tomato using microsynteny with the Arabidopsis genome: the Diageotropica (Dgt) locus. Genome Biology 3(9).
- OTTOMAN, R.J.; HANE, D.C.; BROWN, C.R.; YILMA, S.; JAMES, S.R.; MOSLEY, A.R.; CROSSLIN, J.M.; VALES, M.I. 2009. Validation and Implementation of Marker-Assisted Selection (MAS) for PVY Resistance (*Ry<sup>adg</sup>* gene) in Tetraploid Potato Breeding Program. American Journal of Potato Research 86:304-314.
- RIZZA, M.D.; VILARÓ, F.L.; TORRES, D.G.; MAESO, D. 2006. Detection of PVY Extreme Resistance Genes in Potato Germplasm from Uruguayan Breeding Program. American Potato Journal 83:297-304.
- ROSS, H. 1952. Studies on mosaic resistance in the potato. En: Proceedings of the Conference on Potato Virus Diseases.

- ROSS, H. 1958. Inheritance of extreme resistance to potato virus Y in *Solanum stoloniferum* and its hybrids with *Solanum tuberosum*. En: Quak, F.; Dijkstra, J.; Beemster, A.B.R.; van der Want, J.P.H. Proceedings of the 3rd Conference on Potato Virus Diseases. H. Veenman & Zoonen.
- SHIRANITA, A.; KASAI, K.; HAMALAINEN, J.H.; VALKONEN, J.P.T.; WATANABE, K.N. 1999. Applicability of the Resistance Gene-Like Fragment ADG2 as an RFLP Probe in Selection of Extreme Resistance to Potato Y Potyvirus (PVY). Plant Biotechnology 16(5):361-369.
- SINGH, R. P.; VALKONEN, J. P. T.; GRAY, S. M.; BOONHAM, N.; JONES, R. A. C.; KERLAN, C.; SCHUBERT, J. 2008. Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. Archives of Virology 153: 1-13.
- SILBERSCHMIDT, K. 1954. Virosis de la papa en la sierra. En: Estación Experimental Agraria La Molina. Informe 93. PCEA.
- SON, Y.; HEPTING, L.; SCHWEIZER, G.; HARTL, L.; WENZWEL, G.; SCHWARZFISCHER, A. 2005. Mapping of extreme resistance to PVY (*R<sub>Ysto</sub>*) on chromosome XII using anther-culture-derived primar dihaploid potato lines. Theoretical and Applied Genetics 111:879-887.
- SORRI, V.A.; WATANABE, K.N.; VALKONEN, J.P.T. 1999. Predicted kinase-3<sup>a</sup> motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance. Theoretical and Applied Genetics 99:164-170.
- SPOONER, D. M.; NÚÑEZ, J.; TRUJILLO, G.; HERRERA, R.; GUZMAN, F.; GHISLAIN, M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. PNAS 104:19398-19403.
- STANDFIELD, W.D. 1992. Ligamiento y mapeo cromosómico En: Genética. 3ra edición. McGraw-Hill.
- SUZUKI D. T.; GRIFFITHS A. J. F.; MILLER J. H.; LEWONTIN R. C. 1986. An Introduction to Genetic Analysis. 3<sup>o</sup> Ed. W. H. Freeman and Company. U.S.A.

- THIEME, R.; THIEME, T. 2005. Resistance to Viruses. En: Razdan, M.K.; Mattoo, A.K. (Eds.). Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volumen I: Potato. Science Publisher, Inc. New Hampshire.
- VALKONEN, J. P. T.; SLACK, S. A.; PLAISTED, R. L.; WATANABE, K. N. 1994. Extreme Resistance is Epistatic to Hypersensitive Resistance to Potato Virus Y<sup>0</sup> in a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*-Derived Potato Genotype. Plant Disease 78(12):1177-1180.
- VALKONEN, J.P.T.; JONES, R.A.; SLACK, S.A.; WATANABE, K.N. 1996. Resistance specificities to viruses in potato: standardization of nomenclature. Plant Breeding 115: 433-438.
- VALKONEN, J. P. T.; ROKKA, V. M.; WATANABE, K. N. 1998. Examination of the Leaf-Drop Symptom of Virus-Infected Potato Using Anther Culture-Derived Haploids. Phytopathology 88(10):1073-1077.
- VALKONEN, J.P.T. 2007. Potato viruses: economical losses and biotechnological potential. En: Vreugdenhil, D.; Bradshaw, C.; Gebhardt, C.; Govers, F.; MacKerron, D.K.L.; Taylor, M.A.; Ross, H.A. Potato Biology and Biotechnology. Elsevier.
- VAN DER VOORT, J. R.; KANKUYA, K.; VAN DER VOSSEN, E.; BENDAHMANE, A.; MOOIJMAN, P.; KLEIN-LANKHORST, R.; STIEKEMA, W.; BAULCOMBE, D. 1999. Tight physical Linkage of the Nematode Resistance Gene *Gpa2* and the virus resistance Rx on a Single Segment Introgressed from the Wild Species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into Cultivated Potato. MPMI 12(3):197 – 206
- VISSER, R.G.F.; BACHEM, C.W.B.; DE BOER, J.M.; BRYAN, G.J.; CHAKRABATI, S.K.; FEINGOLD, S.; GROMADKA, R.; VAN HAM, R.C.H.J.; HUANG, S.; JACOBS, J.M.E.; KUZNETSOV, B.; DE MELO, P.E.; MILBOURNE, D.; ORJEDA, G.; SAGREDO, B.; TANG, X. 2009. Sequencing the Potato Genome: Outline and First Results to Come from the Elucidation of

the Sequence of the World's Third Most Important Food Crop. American Journal of Potato Research 86(6):417-429.

- WHITWORTH, J.L.; NOVY, R.G.; HALL, D.G.; CROSSLIN, J.M.; BROWN, C.R. 2009. Characterization of Broad Spectrum Potato Virus Y Resistance in a *Solanum tuberosum* ssp *andigena*-Derived Population and Select Breeding Clones Using Molecular Markers, Grafting, and Field Inoculations. American Journal of Potato Research 86:286-296.
- WITEK, K.; STRZELCZYK-ZYTA, D.; HENING, J.; MARCZEWSKI, W. 2006. A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles *Ry-fst* and *Ns*. Theoretical and Applied Genetics 18:273-275.
- WOODCOCK, K.M.; HOWARD, H.W. 1975. Calyx types of *Solanum tuberosum* dihaploids, *S. stenotomum*, *S. sparsipilum* and their hybrids. Potato Research 18(3):460-465.
- ZHANG, H.; VALKONEN, J.P.T.; WATANABE, K.N. 2003. A Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Library for Potato and Identification of Clones to the Potato Y Potyvirus Resistance Gene *Ry<sub>adg</sub>*. Breeding Science 53:155-161.



## 10. ANEXOS

---

**Anexo 1: Entradas del germoplasma de *S. tuberosum* ssp *andigena* evaluadas en el presente estudio.**

Código CIP	País	Localidad
700050	PER	Apurímac
700124	PER	Junín
700141	PER	Puno
700174	PER	Junín
700347	PER	Junín
700425	PER	Junín
700532	PER	Ancash
700785	PER	La Libertad
700788	PER	Junín
700829	PER	Ancash
700908	PER	Junín
700932	PER	Junín
700941	PER	Junín
701127	PER	Junín
701142	PER	Ancash
701242	PER	Junín
701313	PER	Junín
701589	PER	Junín
701751	PER	Ayacucho
701842	PER	Junín
701986	PER	Junín
702203	PER	Junín
702261	PER	Ayacucho
702270	BOL	La Paz
702299	BOL	La Paz
702312	BOL	La Paz
702477	PER	Junín
702514	PER	Junín
702535	BOL	Potosí
702568	BOL	Potosí
702599	BOL	La Paz
702824	PER	Puno
702829	PER	Puno
702867	PER	Puno
702870	PER	Cusco
703008	PER	Junín
703144	PER	Junín
703245	BOL	Cochabamba
703248	BOL	Cochabamba
703264	PER	Huánuco
703269	COL	Nariño
703284	BOL	Cochabamba
703306	BOL	Cochabamba
703310	PER	Lima

703353	PER	Puno
703365	COL	Boyaca
703369	COL	Nariño
703370	COL	Boyaca
703377	COL	Cauca
703381	COL	Cundinamarca
703383	COL	Nariño
703415	PER	La Libertad
703426	PER	Huánuco
703428	PER	Lima
703431	PER	Puno
703456	VEN	Merida
703457	VEN	Trujillo
703461	VEN	Trujillo
703462	VEN	Merida
703477	PER	Cajamarca
703480	PER	Cajamarca
703482	PER	Cajamarca
703499	PER	Huánuco
703502	PER	Ancash
703505	PER	Amazonas
703543	COL	Nariño
703557	COL	Nariño
703558	COL	Nariño
703578	COL	Cundinamarca
703583	COL	Nariño
703587	COL	Nariño
703590	COL	Nariño
703671	PER	Cajamarca
703687	PER	Huancavelica
703690	PER	Huancavelica
703721	PER	Ancash
703739	PER	Ancash
703740	PER	Ancash
703750	PER	La Libertad
703759	BOL	Oruro
703789	PER	Lima
703815	PER	Amazonas
703830	PER	Pasco
703839	PER	Puno
703840	PER	Puno
703907	ECU	Carchi
703912	PER	Cusco
703942	PER	Cusco
703951	PER	Cusco
703988	PER	Apurímac
703989	PER	Apurímac
704002	PER	Cusco
704073	BOL	Potosi
704078	BOL	Potosi
704086	BOL	Potosi
704110	VEN	Trujillo

704130	PER	Huánuco
704144	ARG	Salta
704148	ARG	Salta
704152	ARG	Salta
704157	ARG	Salta
704222	PER	Lima
704225	ECU	Quito
704276	PER	Pasco
704308	ECU	Bolívar
704309	ECU	Bolívar
704338	ECU	Carchi
704353	ECU	Chimborazo
704355	PER	Apurímac
704365	PER	La Libertad
704368	PER	La Libertad
704389	PER	Lima
704392	PER	Lima
704409	PER	Puno
704429	PER	Amazonas
704434	PER	Pasco
704437	PER	Pasco
704469	PER	Pasco
704470	PER	Pasco
704472	PER	Pasco
704497	PER	Cusco
704502	PER	Apurímac
704504	PER	Apurímac
704507	PER	Apurímac
704532	PER	Cusco
704574	PER	Apurímac
704578	PER	Apurímac
704592	PER	Cusco
704601	PER	Cusco
704609	PER	Cusco
704626	PER	Apurímac
704627	PER	Apurímac
704629	PER	Apurímac
704633	PER	Ayacucho
704636	PER	Ayacucho
704647	PER	Ayacucho
704662	PER	Ayacucho
704669	PER	Puno
704670	PER	Cusco
704673	PER	Cusco
704684	PER	Puno
704729	VEN	Trujillo
704736	ARG	Jujuy
704746	ARG	Jujuy
704756	BOL	Potosí
704757	BOL	Potosí
704773	BOL	Oruro
704828	BOL	Oruro

704832	BOL	La Paz
704852	BOL	Cochabamba
704864	BOL	Cochabamba
704865	BOL	Cochabamba
704892	BOL	Cochabamba
704903	BOL	Cochabamba
704908	BOL	Cochabamba
704934	BOL	Cochabamba
704935	BOL	Cochabamba
704944	BOL	Cochabamba
704954	BOL	Cochabamba
704962	BOL	Cochabamba
704963	BOL	Cochabamba
704964	BOL	Cochabamba
704974	BOL	La Paz
704981	BOL	Potosi
704987	BOL	Potosi
705082	COL	Cundinamarca
705086	COL	Boyaca
705088	COL	Boyaca
705095	COL	Boyaca
705102	COL	Santander
705104	COL	Boyaca
705111	COL	Nariño
705114	COL	Nariño
705132	COL	Valle
705139	COL	Boyaca
705191	ECU	Imbabura
705206	ECU	Imbabura
705214	ECU	Carchi
705223	ECU	Carchi
705234	ECU	Loja
705236	ECU	Loja
705238	ECU	Loja
705247	ECU	Azuay
705253	ECU	Cañar
705257	ECU	Cañar
705264	ECU	Cañar
705265	ECU	Cañar
705271	ECU	Bolivar
705299	ECU	Chimborazo
705312	ECU	Tungurahua
705314	ECU	Cotopaxi
705316	ECU	Cotopaxi
705332	ECU	Pichincha
705336	ECU	Cotopaxi
705340	ECU	Chimborazo
705342	ECU	Chimborazo
705349	ECU	Imbabura
705368	ECU	-
705378	ECU	Cotopaxi
705438	PER	Ayacucho

705443	PER	Ayacucho
705445	PER	Ayacucho
705447	PER	Ayacucho
705451	PER	Ayacucho
705454	PER	Ayacucho
705498	PER	Ayacucho
705515	PER	Ayacucho
705533	PER	Apurimac
705548	PER	Apurimac
705556	PER	Apurimac
705570	PER	Ayacucho
705601	PER	Cusco
705612	PER	Puno
705615	PER	Huancavelica
705622	PER	Huancavelica
705644	PER	Junín
705655	PER	Ancash
705699	PER	La Libertad
705704	PER	Lambayeque
705705	PER	Lambayeque
705707	PER	Piura
705710	PER	Piura
705731	PER	Ancash
705734	PER	Ancash
705739	PER	Ancash
705772	PER	Junín
705777	PER	Junín
705780	PER	Junín
705790	PER	Junín
705809	COL	Boyaca
705812	COL	Santander
705873	ARG	Tarija
705874	ARG	Jujuy
705884	ARG	Salta
705887	ARG	Salta
705903	ARG	Catamarca
705911	ARG	-
706095	PER	Puno
706159	ARG	Catamarca
706160	ARG	Salta
706163	BOL	-
706166	PER	Cusco
706172	ECU	Imbabura
706185	PER	Ayacucho
706724	PER	Ayacucho
706736	ARG	Jujuy
707128	PER	Ayacucho
707343	PER	Cusco
710416	ARG	Salta
712508	PER	Junín
712762	PER	Junín